



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/025, 14/16, A61K 39/295, 47/48	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/51630 (43) Date de publication internationale: 14 octobre 1999 (14.10.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00792</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 avril 1999 (06.04.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/04323 7 avril 1998 (07.04.98) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur Calmette, Boîte postale 245, F-59019 Lille Cedex (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LE GAL, Frédérique, Anne [FR/FR]; 21, rue du Donjon, F-94300 Vincennes (FR). GUILLET, Jean, Gérard [FR/FR]; 39, rue Raphaël, F-92170 Vanves (FR). GAHERY-SEGARD, Hanne [FR/FR]; 14, rue Sautette, F-75014 Paris (FR). GRAS-MASSE, Hélène [FR/FR]; 321, rue de la Rosière, F-59710 Merignies (FR). MELNYK, Oleg [FR/FR]; 9, rue Gabriel Péri, F-59370 Mons-en-Baroeul (FR). TARTAR,</p>		<p>André [FR/FR]; 1, rue du Marlin, F-62490 Vitry-en-Artois (FR).</p> <p>(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harle & Phélip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: LIPOPEPTIDES INDUCING T LYMPHOCYTIC CYTOTOXICITY BEARING AT LEAST ONE AUXILIARY T EPITOPE, AND USES FOR VACCINATION</p>		
<p>(54) Titre: LIPOPEPTIDES INDUCTEURS DE CYTOTOXICITE T LYMPHOCYTAIRE PORTANT AU MOINS UN EPITOPE T AUXILIAIRE, ET LEURS UTILISATIONS POUR LA VACCINATION</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns lipopeptides comprising at least one auxiliary T epitope, at least one CTL epitope and at least a lipid residue, characterised in that the epitopes and the lipid part, and the epitopes are independently separated by amino acids, called spacers, comprising amino acid chains charged in neutral medium, ensuring affinity for water of said lipopeptides. The invention also concerns the use of said lipopeptides for inducing an immune response against HIV and BHV, papillo virus, melanoma p-53, or malaria.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>Lipopeptides comprenant au moins un épitope T auxiliaire, au moins un épitope CTL et au moins un résidu lipidique, caractérisés en ce que les épitopes et la partie lipidique d'une part, et les épitopes d'autre part, sont séparés indépendamment par des séquences d'acides aminés, appelées espaceurs, comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie de ces lipopeptides. Utilisation de ces lipopeptides pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la p-53 du mélanome, ou de la malaria.</p>		

**« Lipopeptides inducteurs de cytotoxicité T lymphocytaire
portant au moins un épitope T auxiliaire, et leurs utilisations
pour la vaccination »**

La présente invention concerne des lipopeptides inducteurs de
cytotoxicité T lymphocytaire et comprenant au moins un épitope T
auxiliaire. Elle est en outre relative à l'utilisation de ces lipopeptides
comme vaccin.

Il existe deux types de réponses immunitaires: la réponse
humorale due aux anticorps, et la réponse cytotoxique due aux
lymphocytes T CD8⁺.

Une réponse cytotoxique efficace requiert la présentation des
antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL), en association
avec les molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité
(MHC), mais aussi aux lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (HTL) en
association avec les molécules de classe II du MHC.

L'utilisation de lipopeptides pour l'induction d'une réponse
cytotoxique, c'est-à-dire la génération in vivo de lymphocytes T
cytotoxiques a déjà été décrite. En particulier, la demande FR-90 15 870
(publication 2.670 787.) (Institut Pasteur de Lille, Institut Pasteur,
INSERM) décrit des lipopeptides constitués d'une partie peptidique
comprenant de 10 à 40 acides aminés et d'une partie lipidique qui peut
être dérivée d'acides gras ou de groupements stéroïdes.

Ces lipopeptides montrent une bonne aptitude à induire une
réponse cytotoxique. Il convenait cependant de les rendre capables
d'induire également une réponse T auxiliaire, dont on sait l'importance
pour l'induction et le maintien de la réponse cytotoxique.

A la connaissance des demandeurs, seul un article au nom de
VITIELLO et al. (1995, J. Clin. Invest., 95, 341-349) a évoqué la
possibilité de combiner sur une même molécule lipopeptidique un
épitope CTL et un épitope induisant une réponse auxiliaire (épitope
T-HELPER ou HTL).

La synthèse de deux lipopeptides est décrite dans cet article. Le
premier est constitué de la partie 18-27 du core du virus de l'hépatite B,
en tant qu'épitope CTL, de la partie 830-843 de la toxine tétanique,

comme épitope T auxiliaire, et de deux chaînes palmitoyles. Les auteurs observent l'induction d'une cytotoxicité T-lymphocytaire.

Le second lipopeptide est constitué de l'épitope NP 147-155 du virus influenza murin, d'un épitope T auxiliaire et de chaînes lipidiques.

5 Néanmoins, les lipopeptides décrits dans cet article présentent une faible solubilité, due à la présence d'une part de la partie lipidique, et d'autre part de motifs peptidiques hydrophobes. On notera à ce sujet que les produits décrits par ces auteurs sont stockés en solutions mères dans du DMSO concentré, et dilués extemporanément pour l'injection

10 dans une solution aqueuse tamponnée.

Cette forte hydrophobicité rend difficile la fabrication de solutions de ces lipopeptides, et de ce fait limite considérablement les possibilités de stérilisation par filtration, qui est la méthode généralement utilisée en raison de sa facilité de mise en œuvre. Elle limite en outre fortement

15 toute possibilité de caractérisation.

Le problème à résoudre consistait donc à réduire l'hydrophobicité des lipopeptides multi-épitopes tout en maintenant l'accessibilité à l'apprêtement nécessaire à l'acheminement du motif épitope CTL vers le CMH de classe I.

20 La présente invention a pour objet de résoudre ce problème.

Les inventeurs ont maintenant trouvé qu'il était possible non seulement d'augmenter l'hydrophilie des molécules lipopeptidiques, mais aussi de limiter des interactions entre les différents épitopes, en introduisant des séquences hydrophiles d'acides aminés, appelées

25 espaceurs, au sein de ces molécules.

La présente invention a donc pour objet des lipopeptides comprenant au moins un épitope T auxiliaire, au moins un épitope CTL et au moins un résidu lipidique caractérisés en ce que les épitopes et la partie lipidique d'une part, et les épitopes d'autre part, sont séparés

30 indépendamment par des séquences d'acides aminés, appelées espaceurs, comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie du lipopeptide.

De manière préférentielle, les espaceurs sont accessibles à un

35 apprêtement protéolytique par le protéasome, préalable à la libération du

motif épitope CTL. Cette accessibilité peut être mise en évidence comme décrit par OSSENDORP et al. (1996, Immunity, 5, 115-124).

De manière préférentielle les espaceurs comprennent entre 1 et 10, préférentiellement entre 2 et 4 acides aminés, le nombre d'acides aminés étant suffisant pour obtenir des espaceurs globalement chargés en milieu neutre. Préférentiellement, au moins un des espaceurs comprend des arginines et/ou des glycines. Les arginines présentent l'avantage d'être chargées aux pH physiologiques, et de créer des sites de sensibilité particulière au clivage protéolytique lors de l'apprêtement des épitopes.

Les glycines présentent l'avantage de permettre l'introduction, au sein de la partie peptidique du lipopeptide, d'un site éventuel pour une synthèse convergente par couplage de fragment.

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux de l'invention, au moins un des espaceurs présente l'une des séquences suivantes:

GLY ARG ou ARG GLY ARG.

L'acide glutamique et/ou l'acide aspartique présentent également d'intéressantes propriétés applicables à la réalisation d'espaceurs selon la présente invention (accès à la dégradation protéolytique naturelle, et introduction de fonctions carboxylates ionisées en milieu physiologique à pH neutre).

Ces acides aminés, rentrant dans la séquence des espaceurs, peuvent avantageusement être remplacés par leurs dérivés, ou par d'autres acides aminés fonctionnellement équivalents.

Ces acides aminés peuvent, au sein des espaceurs, être séparés par des acides aminés peu encombrés d'un point de vue chimique, c'est-à-dire présentant des chaînes latérales courtes, qui peuvent être, outre la glycine, l'alanine. La présence de ces acides aminés à chaîne courte facilite la protéolyse.

Une cystéine, ou une chaîne alkyle fonctionnalisée par un groupe thiol, capable de ménager un site possible de ligation chimique simple

entre deux fragments peptidiques grâce à la formation de liaisons covalentes non peptidiques peut aussi être introduite dans l'espaceur. Il est ainsi possible de réaliser une liaison disulfure entre deux peptides différents, comportant chacun une fonction thiol, ou une liaison thioéther, auquel cas l'un des deux peptides doit être fonctionnalisé par un halogénure d'alkyle.

Les deux peptides peuvent aussi être liés par formation d'un hétérocycle thiazolidine l'un des peptides amenant une fonction aldéhyde. Cette fonction aldéhyde peut être facilement et sélectivement générée sous forme d'un groupement alpha-oxo acyle, obtenu par oxydation périodique d'une sérine, d'une thréonine, ou d'une cystéine introduite en position N-terminale d'un fragment peptidique

Il est aussi possible d'associer les deux peptides en utilisant la réactivité des aldéhydes avec des bases faibles, ou des méthodes de ligation via la formation d'une oxime (par réaction entre une fonction aldéhyde et une fonction amino-oxyacétyle), d'une hydrazone (par réaction entre une fonction aldéhyde et une hydrazide ou une aryl-hydrazine). Ces réactions de base sont rappelées dans la revue de James Tam et Jane Spetzler.(Biomed. Pep., Prot. and Nucleic Acids (1995), 1, 123-132).

Une méthode de ligation consistant à générer une liaison hydrazone à partir d'une alkyl-hydrazine (générée par N-amination d'un précurseur amine) et d'un partenaire fonctionnalisé par un groupement alpha-oxo acyle a été récemment développée.

Les hydrazinopeptides sont synthétisés par N-amination selon Klinguer et al. (Tet. Lett. (1996), 37, 7259-7262). Cette méthodologie permet de transformer n'importe quelle fonction amine du peptide en fonction hydrazine. La fonction hydrazine peut ainsi être située en position N-terminale, ou sur la chaîne latérale d'un acide aminé situé à n'importe quel endroit de la séquence. La fonction amine transformée peut être une fonction amine alpha, epsilon d'une lysine ou de l'acide

aminocaproïque, une fonction delta amino d'une ornithine, ou toute autre fonction amine primaire ou secondaire.

Les peptides aldéhydes sont générés comme décrits par Tam et Spetzler (Biomed. Pep., Prot. and Nucleic Acids (1995), 1, 123-132).

5 Les résidus sérine, thréonine ou cystéine précurseurs du groupement alpha-oxo acyle peuvent être situés en position N-terminale, ou sur toute fonction amine d'une chaîne latérale à partir du moment où ces résidus ne sont pas présents en position N-terminale dans les épitopes considérés.

10 Le groupement lipidique peut être porté indifféremment par l'hydrazinopeptide ou le peptide aldéhyde.

On entend, pour la compréhension de la présente invention, par épitope T auxiliaire, une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe II.

15 On entend par épitope CTL une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe I.

Les épitopes T auxiliaires capables de s'associer à plusieurs récepteurs HLA de classe II différents sont appelés épitopes auxiliaires multivalents (HTL multivalents).

20 Les lipopeptides selon la présente invention comprennent préférentiellement l'enchaînement de:

- une partie lipidique;
- un premier espaceur;
- 25 - un épitope T auxiliaire;
- un second espaceur; et
- un épitope CTL.

Ils peuvent aussi comprendre :

- 30
- une partie lipidique;
 - un premier espaceur;
 - un épitope T auxiliaire;
 - un second espaceur;

- un épitope CTL;
- un troisième espaceur; et
- un second épitope CTL.

5 Les divers épitopes auxiliaires et CTL peuvent être présents dans des ordres différents dans l'enchaînement d'acides aminés. Ainsi, un épitope auxiliaire peut être compris entre deux épitopes CTL, desquels il sera séparé par deux espaceurs.

10 La partie lipidique du lipopeptide est avantageusement obtenue par addition d'un motif lipidique sur une fonction alpha aminée d'un peptide ou sur une fonction réactive de la chaîne latérale d'un acide aminé de la partie peptidique, telle qu'une fonction epsilon amine ou thiol. Elle peut comprendre une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras en C₁₀ à C₂₀, éventuellement ramifiées ou insaturées ou un dérivé d'un stéroïde.

15 De manière avantageuse, la partie lipidique comprend au moins deux chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C₁₀ à C₂₀ liées aussi entre elles par l'intermédiaire d'un ou plusieurs acides aminés. La partie lipidique peut ainsi être constituée de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH₂, alpha et epsilon, d'une lysine.

20 La partie lipidique peut aussi être constituée de, ou comprendre, un résidu d'acide palmitique, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique, d'acide 2-amino hexadécanoïque, de pimélate ou de trimélate.

25 La partie non lipidique comprend quant à elle entre 15 et 100, et préférentiellement entre 15 et 50 acides aminés. Le nombre d'acides aminés dépend du nombre d'épitopes constituant la partie non lipidique du lipopeptide, et de leurs tailles.

30 De manière avantageuse, l'épitope T auxiliaire est un épitope capable de s'associer à plusieurs récepteurs HLA de classe II différents, c'est-à-dire un épitope multivalent. Il est préférentiellement l'épitope auxiliaire constitué par le peptide 830-843 de la toxine tétanique présentant la séquence suivante:

La glutamine (Q) de cette séquence peut éventuellement être acétylée.

D'autres épitopes HTL multivalents peuvent être l'épitope multivalent de l'hémagglutinine (PREVOST-BLONDEL et al. 1995, J. Virol., vol.62, n°12, pages 8046-8055) ou encore l'épitope PADRE (ALEXANDER et al., 1994, Immunity, 1, 751).

L'épitope CTL peut quant à lui être tout épitope capable d'activer des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺.

Il est préférentiellement un épitope CTL d'une protéine présentée par une cellule tumorale et en particulier par un mélanome, d'une protéine du VIH, du virus de l'hépatite B (VHB) ou du papillomavirus, ou encore de la protéine p53.

Il peut être en particulier l'un des épitopes suivants:

- épitopes de la protéine BCR-ABL, résultant de la translocation BCR- Abelson (leucémie myéloïde chronique) tels que mentionnés dans le tableau 1.

- épitopes de la protéine p53, tels que ceux mentionnés dans le tableau 2.

Les épitopes de la protéine p53 peuvent en outre être pris dans les séquences 25-35, 63-73, 129-156, 149-156, 187-205, 187-234, 226-264, ou 249-264 de cette protéine.

- épitopes des protéines E₆ ou E₇ du papillomavirus humain (VPH), tels que ceux mentionnés dans le tableau 3.

- épitopes de protéines du virus VIH-1 tels que ceux mentionnés dans le tableau 4,

- épitopes du mélanome ou d'autres tumeurs, tels que ceux mentionnés dans les tableaux 5, 6 et 7 et en particulier épitopes de l'antigène melan-A/mart-1 du mélanome.

D'autres épitopes CTL plurivalents présentant une capacité d'association avec des HLA de classe I peuvent être ceux compris dans le peptide 43-57 de HPV (GQAEPDRAHNIVTF) qui contient des épitopes HLA A2, A24, B7 et B18.

Les épitopes CTL peuvent encore être ceux d'antigènes parasitaires, et en particulier ceux d'une protéine du stade intra-hépatocytaire de *Plasmodium falciparum*.

La liaison entre la partie lipidique et la partie non lipidique est préférentiellement effectuée par l'intermédiaire du groupement ϵ -NH₂ du premier acide aminé de la partie non lipidique. Elle peut néanmoins être effectuée par tout autre moyen, et en particulier par le groupement α -NH₂ d'une lysine.

Les lipopeptides selon la présente invention peuvent être administrés aux patients à traiter, en particulier aux personnes à vacciner, dilués dans un solvant adéquat, tel que par exemple un tampon physiologiquement acceptable. Ils peuvent néanmoins être mis sous une forme galénique compatible avec une administration par voie parentérale, sublinguale, intrapulmonaire ou transdermique.

Ils peuvent être administrés par tout mode d'administration permettant une action efficace. Ce mode sera choisi en fonction de la maladie à traiter. A titre non limitatif, les lipopeptides peuvent en particulier être administrés par injection ou par voie sublinguale.

Un autre objet de la présente invention est donc l'utilisation de ces lipopeptides pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin, préventif ou curatif, pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique, et en particulier, pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre de cancers tels que le mélanome, des virus VIH et VHB, des papillomavirus, de la p53 ou de la malaria.

La présente invention a encore pour objet une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une quantité pharmacologiquement active d'un ou plusieurs des lipopeptides décrits ci-dessus, ainsi que des excipients pharmaceutiquement compatibles.

On notera enfin que les épitopes CTL décrits dans la présente demande constituent en eux-mêmes des objets de la présente invention.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent.

La figure 1 illustre la reconnaissance des lipopeptides monopalmitoyle et dipalmitoyle selon l'invention, comprenant l'épitope Mart 27-35, par une lignée de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques dudit épitope dans un test Elispot-interféron gamma (IFN- γ).

Les figures 2A et 2B illustrent la reconnaissance des lipopeptides mentionnés pour la figure 1, par deux clones de lymphocytes infiltrants de mélanomes, respectivement LT8 et LT12, spécifiques de l'épitope Mart 27-35.

La figure 3 illustre l'induction d'une activité T-auxiliaire par le peptide TT 830-843 constitutif des lipopeptides selon l'invention.

-Figure 3a: sécrétion d'Interféron- γ par des cellules de ganglions lymphatiques de souris transgéniques HLA-A2 auxquelles on a injecté:

- (A) Tampon NaCl
- (B) lipopeptide Mp-MART;
- (C) Lipopeptide Dp-MART.

- Figure 3b: prolifération des cellules des ganglions lymphatiques de souris transgéniques HLA-A2 en réponse aux mêmes antigènes.

La figure 4 illustre l'induction de la sécrétion d'Interféron- γ par des cellules des ganglions lymphatiques de souris transgéniques HLA-A2 en réponse à:

- (a) mélange des peptides MART 27-35 et TT 830-845;
- (b) lipopeptide Mp-MART;
- (c) lipopeptide Dp-MART.

La figure 5 représente la formule d'un lipopeptide comprenant une liaison hydrazone.

La figure 6 illustre l'antigénicité des épitopes HIV et de leurs lipopeptides correspondants.

Des PBMC de patients séropositifs pour HIV ont été incubés avec les peptides sélectionnés (barres pleines) ou les lipopeptides correspondants (barres pointillées). L'activation des CTL spécifiques a été suivie en utilisant le test ELISPOT spécifique de l'Interféron- γ . Les codes affectés à chaque patient et leur type HLA sont indiqués. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

La figure 7 illustre l'immunogénicité des épitopes restreints au HLA-A2 et HLA-A3 et les lipopeptides correspondants.

(a) les peptides ou lipopeptides indiqués ont été injectés à des souris transgéniques HLA-A2. Avant injection à la base de la queue, les peptides ont été mélangés avec l'épitope T-auxiliaire TT 830-843 et émulsifiés dans de l'adjuvant incomplet de Freund; simultanément les lipopeptides ont été dilués dans du tampon physiologique. La production de CTL spécifique a été déterminée à l'aide du test ELISPOT spécifique de l'Interféron- γ , après incubation des cellules des ganglions lymphatiques avec des cellules cibles de type Jurkat-A2 K^B préincubés en présence (barre pointillée) ou en l'absence (barre pleine) de l'épitope CTL indiqué.

(b) les peptides ou les lipopeptides indiqués ont été injectés à la base de la queue de souris transgéniques HLA-A3. La production de CTL spécifiques a été déterminée par le test ELISPOT spécifique de l'Interféron- γ , après incubation des cellules des ganglions lymphatiques avec des cellules cibles EBV exprimant le HLA-A3 préincubé en présence (barre pointillée) ou en l'absence (barre pleine) de l'épitope NEF 73-81 de HIV.

Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La figure 8 illustre la nécessité d'un épitope T-auxiliaire de type TT 830-843 pour l'induction de CTL.

(a) Des lipopeptides monopalmitoyle comprenant l'épitope CTL POL 476-484 de HIV dépourvus (lipo POL1) ou non (lipo TT-POL1) de l'épitope T-auxiliaire TT 830-843 ont été dilués dans un tampon physiologique et injectés à la base de la queue de souris transgéniques HLA-A2. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

(b) Des cellules des ganglions lymphatiques de souris immunisées avec le lipopeptide monopalmitoyle TT-POL1, ou le lipopeptide monopalmitoyle TT 830-843 émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund, ou injecté avec de l'adjuvant incomplet de Freund seul, ont été

co-cultivées pendant 72 heures en présence (barre pointillée) ou en l'absence (barre pleine) 30µg/ml de l'épitope T-auxiliaire TT 830-843.

La prolifération cellulaire a été suivie par la mesure de l'incorporation de ³H thymidine . Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la radio-activité (cpm) des cultures (3 puits par point) d'au moins trois expériences.

Exemple 1 Synthèse de lipopeptides dipalmitoylés avec et sans espaceur, et propriétés physico-chimiques

1. Synthèses des lipopeptides

La série des trois lipopeptides suivants a été synthétisée.

Lipopeptide N° 1

Pam-K(Pam)-SS-QYIKANSKFIGITE-AAA-AAGIGILTV

Lipopeptide n°2

Pam-K(Pam)-SS-QYIKANSKFIGITE-RGR-AAGIGILTV

Lipopeptide n°3

Pam-K(Pam)-GR-QYIKANSKFIGITE-RGR-AAGIGILTV

Ces lipopeptides comprennent une extrémité lipidique constituée de deux résidus palmitoyl (Pam) liés au groupement NH₂ d'une lysine, l'épitope auxiliaire de la toxine tétanique (peptide 830-843) et un épitope CTL reconnu dans mart-1 par le récepteur HLA A2.1. L'épitope Hbc 18-27 décrit par VITIELLO et al. (cité supra) est aussi reconnu par HLA A2.1, et présente une hydrophobicité similaire au motif choisi dans la série de lipopeptides précitée.

La différence réside dans les séquences d'acides aminés comprises d'une part entre la partie lipidique et l'épitope auxiliaire et d'autre part, entre l'épitope auxiliaire et l'épitope CTL. Cette série a été

réalisée pour évaluer la possibilité d'obtenir sous forme purifiée et caractérisable des produits définis par référence au produit selon VITIELLO et comportant comme celui-ci deux chaînes palmitoyles: les deux espaceurs de VITIELLO sont reproduits ou modifiés pour l'un ou les deux espaceurs selon la présente invention.

Dans le lipopeptide n° 1, ces séquences sont identiques à celles du lipopeptide décrit par VITIELLO et al.. Deux sérines sont insérées entre la partie lipidique et l'épitope auxiliaire. Trois alanines sont quant à elles placées entre l'épitope auxiliaire et l'épitope CTL.

Le lipopeptide n°2 comprend les séquences SS (séryl-séryl) et ARG - GLY - ARG.

Le lipopeptide n° 3 est construit selon la présente invention, et comprend des espaceurs hydrophiles présentant respectivement les séquences GLY-ARG et ARG-GLY-ARG.

La synthèse a été réalisée selon des procédures « standards » utilisées en phase solide selon la stratégie Boc-benzyle décrite par Merrifield (1963 J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; 1986 Science 232, 341-347). L'introduction en position N-terminale d'une di-Boc Lysine permet, après déprotection de la peptidyl résine, l'introduction simultanée des deux chaînes palmitoyle, pour obtenir le dérivé attendu.

2. Purification et propriétés physico-chimiques des lipopeptides.

Le lipopeptide n° 1 est pratiquement insoluble dans l'eau, ou dans un mélange DMSO/eau 10% V/V. Il s'avère non purifiable, non caractérisable par HPLC selon des méthodes résolutes, en raison de la formation d'agrégats. L'identité de ce lipopeptide a pu être confirmée par mesure de la masse par spectrométrie PDMS-TOF, réalisée sur le produit brut, immédiatement après le clivage terminal par l'acide fluorhydrique et avant lyophilisation. Le produit devient totalement insoluble dans l'eau après lyophilisation.

La mesure de la masse par spectrométrie PDMS-TOF du lipopeptide n°2 est possible, et confirme que le produit attendu a bien été obtenu. Cependant, ce produit adopte dans l'eau un comportement voisin du lipopeptide n°1, et ne peut donc être correctement analysé.

Le lipopeptide n° 3 est soluble dans l'acide acétique à 80%. Il peut être stérilisable par filtration sur un microfiltre de 0,22 µm. Il peut être en outre dissous dans une solution DMSO/eau 10% V/V. La mesure de la masse par spectrométrie PDMS-TOF confirme la présence du produit attendu. Le produit s'avère purifiable après injection d'une solution concentrée dans le DMSO, sur colonne Vydac C4, à 60°C, en utilisant un gradient d'acétonitrile, en présence du contre-ion TFA. Le produit est caractérisable par HPLC selon plusieurs méthodes résolutives conventionnelles, sur colonnes Vydac C4, Zorbax C3, Zorbax CN, Zorbax C1, à 60°C, à l'aide de gradients d'acétonitrile en présence d'un contre-ion TFA, ou en utilisant un modificateur organique, tel que l'isopropanol ou le butanol en isocratique.

Le trifluoroacétate du lipopeptide n°3 est soluble dans le DMSO (20-25 mg/mL), et reste soluble après dilution par de l'eau (DMSO 10%). L'échange du contre-ion trifluoroacétate pour un contre-ion acétate peut être réalisé par RP-HPLC sur une colonne C4: le produit dissous dans le DMSO à 80% est injecté sur la colonne équilibrée par le solvant A (acide acétique à 5% dans l'eau). Après élimination des produits non retenus (contre-ions TFA, sels), le produit est élué par l'aide d'un gradient du solvant A vers le solvant B (acétonitrile 80% - acide acétique à 5% - eau 15%).

L'acétate présente une solubilité comparable à celle du trifluoroacétate. Il a été utilisé pour immuniser des souris transgéniques exprimant HLA-A2, et s'est avéré capable d'induire une réponse CTL satisfaisante en l'absence d'adjuvant d'immunisation.

Ces résultats montrent donc que l'insertion d'espaceur hydrophile entre la partie lipidique et l'épitope auxiliaire d'une part, et d'autre part entre l'épitope auxiliaire et l'épitope CTL permet de solubiliser le lipopeptide, ce qui n'est pas le cas quand les séquences d'acides aminés sont différentes.

**EXEMPLE 2: Synthèse de lipopeptides monopalmitoylés
selon l'invention, et propriétés physico-chimiques:**

Une deuxième série de lipopeptides a été réalisée pour évaluer la
possibilité d'obtenir sous forme purifiée et caractérisable des produits
comportant cette fois-ci une seule chaîne palmitoyle; l'espaceur central
employé est introduit selon la présente invention (-RGR- pour arginyl-
glycyl-arginyl-), tandis que l'espaceur -SS-(seryl-seryl-) de VITIELLO est
maintenu ou remplacé pour l'un ou les deux espaceurs selon la présente
invention.

L'introduction en position N-terminale d'une alpha-Fmoc, epsilon
Boc Lysine permet, après déprotection sélective du groupe Boc,
l'introduction d'une seule chaîne palmitoyle, pour obtenir le produit
suivant:

Lipopeptide n°4:

H-K(Pam)-SS-QYIKANSKFIGITE-RGR-AAGIGILTV

Ce produit s'avère difficilement purifiable. Il n'est soluble en milieu
aqueux qu'en présence de DMSO. Un profil chromatographique peut
être obtenu par RP-HPLC uniquement sur une colonne de type C1 en
utilisant un système solvant « standard » (acétonitrile/eau/acide
trifluoroacétique), selon une méthode peu résolutive, qui ne permet pas
de garantir la réelle pureté du produit.

Le lipopeptide n°5 suivant, a été synthétisé.

Lipopeptide n°5:

H-K(Pam)-GR-QYIKANSKFIGITE-RGR-AAGIGILTV

Ce produit a été obtenu comme le lipopeptide n°4 par acylation
sélective de la fonction epsilon NH_2 de la lysine N-terminale.

Ce lipopeptide n°5 satisfait au critère de purification et de
caractérisation classiques.

Cette comparaison entre les lipopeptides n°4 et n°5, qui sont des lipopeptides monopalmitoyles, confirme les résultats obtenus sur les lipopeptides dipalmitoyles.

Les lipopeptides 3 et 5 ont été les seuls à répondre aux critères définis (accès à une méthode de purification et à des critères analytiques résolutifs). Leur étude a été poursuivie par l'étude de leur reconnaissance par divers types cellulaires. Les résultats de cette étude figurent dans l'exemple 3.

Exemple 3. Activité biologique de lipopeptides dipalmitoyle et monopalmitoyle selon l'invention contenant un épitope CTL mélanome

Le lipopeptide dipalmitoyle n°3 et le lipopeptide monopalmitoyle n°5 synthétisés comme indiqué respectivement dans les exemples 1 et 2 ont été testés.

1°) Etude de la reconnaissance des lipopeptides mono- et dipalm-Mart 27-35 par une lignée de lymphocytes T cytotoxiques humains spécifiques de MART 27-35 dans un test Elispot Interféron- γ (IFN- γ).

a) Matériels et méthodes:

La lignée L28.3 de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de MART 27-35 a été obtenue à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de donneur sain HLA-A2⁺. Le protocole d'induction de ces cellules effectrices à partir de PBMC de donneur naïf a été décrit par Ostankovitch et al. (Int. J. Cancer, 1997, 72, 987-994).

Méthode du test Elispot:

Dans ce test les cellules cibles sont des PBMC autologues non stimulées (naïfs).

50 µl/puits d'anticorps murin anti-IFN γ humain dilué dans du tampon PBS à une concentration de 4 µg/ml sont incubés dans des plaques de 96 puits à fond de nitrocellulose pendant la nuit à 4°C en chambre humide.

5 Les PBMC sont décongelées, maintenues au repos durant 1 heure dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum humain AB (SAB) à 37°C dans une atmosphère, contenant 5% de CO₂. Elles sont ensuite incubées durant une nuit avec les peptides à tester à différentes concentrations (10, 5 et 1 µg/ml).

10 Les puits sont lavés avec du PBS puis saturés avec du milieu RPMI contenant 10% de SAB, pendant 2 heures à 37°C.

Les cellules effectrices sont ensuite distribuées dans les plaques de 96 puits préalablement incubées avec l'anti-IFN γ à raison de 20.000 cellules par puits dans 200µl final et en présence des PBMC autologues stimulées avec un rapport effecteur: cible (E : T) de 1:1. La phytohémagglutinine (PHA) à la concentration de 4 µg/ml et le phorbol 12-méristate 13-acétate (PMA)-ionomycine (150 et 500 ng/ml respectivement) sont utilisées à titre de témoins positifs.

20 Après 20 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, les puits sont lavés 5 fois avec du PBS puis 1 fois avec de l'eau distillée, puis sont incubés toute la nuit à 4°C avec 100µl/puits d'anticorps de lapin anti-IFN γ humain dilué au 1/250ème dans du RPMI contenant 10% de SAB. Les puits sont ensuite lavés 5 fois avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20, puis incubés pendant 2 heures à 37°C avec 100µl d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin biotinylés dilués au 1/500ème dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20 et 1% de BSA (sérum albumine bovine).

25 Les puits sont à nouveau lavés cinq fois avec du PBS-Tween puis incubés pendant 1 heure à 37°C avec 100µl d'ExtrAvidine-Phosphatase Alcaline diluée au 1/600ème dans du PBS-Tween-BSA 1%.

30 Après quatre lavages en PBS-Tween, les puits sont incubés avec 100µl de substrat de révélation (Alkaline phosphatase conjugate substrate kit, Réf. 170-6432. Biorad). Les puits sont ensuite lavés avec de l'eau distillée et séchés avant la lecture des résultats au stéréomicroscope.

35

b) Résultats:

La figure 1 illustre les résultats obtenus.

Les deux lipopeptides de MART 27-35 stimulent de façon spécifique la sécrétion d'IFN γ par la lignée de CTLs anti-MART 27-35. Ils sont donc présentés par les PBMC et reconnus par les CTLs d'une façon comparable au peptide nominal MART 27-35.

2) Etude de la reconnaissance des lipopeptides mono- et dipalmitoylé MART 27-35 par deux clones de lymphocytes infiltrants de mélanomes humains spécifiques de MART 27-35, par un test de cytotoxicité par relargage de ^{51}Cr .**a) Matériels et méthodes:**

LT 8 et LT 12 sont deux clones HLA-A2 $^{+}$ obtenus par la restimulation de lymphocytes infiltrants de mélanome (TILs), qui reconnaissent spécifiquement le peptide MART 27-35.

Les cellules cibles utilisées dans ce test sont des cellules humaines HLA-A2 $^{+}$ de type T2. Ces cellules sont dépourvues de transporteurs de peptide et ne présentent donc que les peptides exogènes sur leurs molécules de classe I libres.

Dans ce test, les cellules cibles sont incubées durant une nuit avec le peptide à tester à raison de 4 $\mu\text{g}/10^6$ cellules, dans une atmosphère contenant 5% de CO $_2$ à 37°C. Elles sont ensuite incubées pendant une heure à 37°C avec 100 μCi de chromate de sodium (^{51}Cr). Les cellules cibles sont ensuite lavées deux fois dans du sérum physiologique contenant 5% de sérum foetal de veau (SVF), reprises dans du milieu RPMI 5% SVF et distribuées dans des plaques de 96 puits à raison de 3000 ou 5000 cellules par puits dans 100 μl .

Les cellules effectrices (LT8 et LT12) ont ensuite été ajoutées dans 100 μl du même milieu avec un rapport effecteur : cible de 10:1.

Le relarguage de chrome obtenu pendant l'incubation de 4 heures à 37 °C a été mesuré sur un compteur gamma. Le pourcentage de lyse est déterminé par la formule suivante (R = relarguage):

% de lyse (R. expérimental - R. spontané/R. total - R.spontané) x 100.

b) Résultats:

Les figures 2A et 2B illustrent les résultats obtenus.

Les deux lipopeptides de MART 27-35, mono et dipalmitique, sont reconnus par des cellules effectrices humaines, provenant de mélanomes et spécifiques du peptide MART 27-35. Ces deux types de lipopeptides sont reconnus de façon similaire, et à un niveau au moins comparable au peptide original (MART 27-35) compte-tenu que les cellules cibles ont été exposées à la même concentration finale de peptides alors que la masse molaire des lipopeptides est environ 5 fois plus élevée que celle du peptide MART 27-35.

3. Caractérisation de l'effet « Helper » de l'épitope T auxiliaire TT 830-843.

a) Matériels et méthodes:

Les souris transgéniques A2/Kb (3 à 4 par groupe) ont été immunisées en IFA par voie sous cutanée à la base de la queue et dans les coussinets plantaires avec soit (A) du sérum physiologique soit (B) 200 µg de Mp-MART, soit (C) 200µg de Dp-MART. Les souris furent sacrifiées 11 jours plus tard.

Un test de prolifération des cellules des ganglions drainants a été réalisé par trois jours de culture en présence du peptide TT 830-843 (10 µg/ml) puis 18 heures d'incorporation de thymidine tritiée.

Le surnageant a été récolté après 36 heures de culture pour le dosage d'IFN-γ par méthode ELISA.

b) Résultats:

Afin de définir la capacité d'induction d'une réponse T auxiliaire apportée par les constructions de lipopeptides. selon l'invention, la sécrétion d'interféron- γ ainsi que la prolifération de lymphocytes en réponse à l'épitope T auxiliaire TT 830-843 a été étudiée chez des souris immunisées avec Mp-MART ou Dp-MART en présence d'adjuvant incomplet de Freund.

Les résultats sont reportés dans la figure 3.

Les résultats indiquent que la construction Mp-MART et la construction Dp-MART (B, C) induisent toutes les deux une forte sécrétion d'interféron- γ par les cellules des ganglions lymphatiques des souris transgéniques de type A2/K^b.

De même, les lipopeptides Mp-MART et Dp-MART (B, C) provoquent une prolifération lymphocytaire importante en réponse au peptide TT 830-843.

Ces résultats démontrent que l'épitope T auxiliaire TT 830-843 est capable d'induire une réponse T auxiliaire chez les souris transgéniques A2/K^b. De plus, ces résultats montrent également que la liaison covalente de l'épitope TT830-843 au sein de la construction lipopeptidique ne réduit pas sa capacité à être présentée aux cellules T.

4) Etude l'effet adjuvant de la partie lipidique des constructions de lipopeptides MART 27-35.**a) Matériels et méthodes:**

Les souris transgéniques A2/Kb (3 à 4 par groupe) ont été immunisées sans adjuvant par voie sous cutanée à la base de la queue et dans les coussinets plantaires avec soit (A) un mélange de peptide MART 27-35 (50 μ g) et de TT 830-843 (140 μ g), soit (B) 200 μ g de Mp-MART (pour assurer l'équimolarité du peptide MART 27-35 par rapport à A), soit (C) 200 μ g de Dp-MART. Les souris furent sacrifiées 11 jours plus tard.

Le nombre de cellules T CD8⁺ spécifiques de MART 27-35 a été déterminé par un test ELISPOT IFN- γ : au cours duquel les cellules ont été exposées à des cellules présentatrices de type Jurkat A2/Kb, soit non chargées à titre de contrôle négatif, soit chargées avec le peptide MART 27-35 (30 μ g/ml). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules sécrétant de l'IFN- γ par million de cellules testées.

b) Résultats:

Afin d'optimiser l'utilisation des constructions colinéaires de lipopeptides comprenant l'épitope T-cytotoxique MART 27-35 pour la vaccination humaine, la capacité de ces constructions lipopeptides à induire une immunisation en l'absence d'adjuvant exogène a été testée.

Les résultats sont présentés dans la figure 4.

Plus particulièrement, l'immunogénicité des deux constructions colinéaires lipopeptidiques comprenant respectivement une ou deux chaînes palmitoyle ont été testées. Les souris ont subi une seule injection en l'absence d'adjuvant, avec chacun des lipopeptides ou encore avec le mélange d'épitope MART 27-35 et TT 830-843 utilisé comme contrôle, puis la sécrétion d'interféron- γ par les splénocytes a été mesurée après une re-stimulation *in vitro* avec le peptide MART 27-35.

Les résultats de la figure 4 indiquent que les constructions colinéaires Mp-MART et Dp-MART sont toutes deux capables d'induire *in vivo* une réponse cellulaire cytotoxique CD8⁺ spécifique de l'épitope T-cytotoxique MART 27-35, en l'absence de tout adjuvant exogène.

Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules des ganglions lymphatiques.

Ces résultats démontrent que l'effet adjuvant des constructions lipopeptidiques colinéaires selon l'invention est suffisant pour induire une immunisation spécifique contre l'épitope T-cytotoxique, en l'absence de tout autre composé adjuvant.

EXEMPLE 4 : Préparation d'un lipopeptide comprenant une liaison hydrazone.

L'hydrazinopeptide et le peptide aldéhyde présentent les formules suivantes:

hydrazinopeptide : $K(NH_2)ILKEPVHGV-OH$ / épitope MHCII-POL HIV-1

peptide aldéhyde : $CHOCO-RTPPAYRPPNAPILK(Pam)-NH_2$ /épitope MHCII-HBVc

Le peptide aldéhyde comprend l'épitope 128-140 de la protéine core du virus de l'hépatite B (HBVc) tel que décrit par MILICH et al. (1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1610-1614).

16 mg (12 μ mol) d'hydrazinopeptide et 15 mg (7 μ mol) de peptide aldéhyde sont dissous dans 4 ml de tampon citrate/phosphate 0,01M pH 5,4 et 1 ml de DMSO. Le pH est ajusté à 5,4 avec Na_2HPO_4 0,2M.

Après 24h, le milieu est dilué avec 5 ml d'acide acétique et purifié sur une colonne C18 (15x500 mm). Eluant A : TFA 0,05% dans H_2O , Eluant B : TFA 0,05% dans CH_3CN/H_2O (80/20). Gradient 0-40%B en 10 min. puis 40-100%B en 60min. Les fractions pures sont collectées et lyophilisées. 4,9 mg de produit pur est obtenu (rendement 22%).

La formule du produit final est représentée sur la figure 5.

EXEMPLE 5- Activité biologique des constructions lipopeptidiques selon l'invention contenant différents épitopes de HIV.

A)Matériels et Méthodes:

1. Synthèse peptidique et caractérisation:

Des lipopeptides ont été synthétisés sur une résine MBHA (Applied Biosystems, Foster City, USA) en utilisant la stratégie classique BOC-benzyle (Merrifield, RB, 1986, Science: Volume 232 pages 341 à

343; Merrifield RB, 1963, J. Am. Chem. Soc. Vol. 85:2149-2154) et hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium 0,33 M (HBTU) dans le N-méthyl-pyrrolidinone (NMP), avec une neutralisation in situ par le diisopropyléthylamine (DIPEA) (Schnolzer et al., 1992, Int. J. Pept. Protéin Res. vol.40, pages 180-193) dans un synthétiseur automatique de peptides du type Applied Biosystem 430A (Foster City, USA). Un double couplage a été systématiquement effectué en utilisant quatre équivalents d'acides aminés protégés, suivis par une étape d'acétylation systématique en utilisant de l'anhydride acétique.

Pour la synthèse des peptides dipalmitoylé, un groupe Boc-Lys(Boc)-OH (Senn Chemicals AG, Dielsdorf, CH) a été incorporé à l'extrémité N-terminale: les groupes Boc ont été simultanément éliminés par traitement classique au TFA. Pour la synthèse des peptides monopalmitylé, un groupe Boc-Lys(Fmoc)-OH (Senn Chemicals AG, Dielsdorf, CH) a été incorporé à l'extrémité N-terminale, ce qui offrait la possibilité d'une élimination sélective du groupe Fmoc par de la pipéridine à 20% dans le NMP. Dans tous les cas, une palmitoylation sur résine a été réalisée en utilisant une activation par le HBTU en présence de DIEA, comme ci-dessus, sur le peptide par ailleurs totalement protégé. Les lipopeptides ont été ensuite déprotégés et séparés de la résine par un traitement au fluorure d'hydrogène (Tam, J.P. 1985, Int. J. Pept. protein Res, Volume 26, pages 262-273) dans un appareil Teflon-Kel F (Asti, Courbevoie, France): un protocole « High HF » a été utilisé pour les lipopeptides TT-POL1 et TT-GAG, un protocole de type « Low-High HF » a été utilisé pour les lipopeptides TT-POL2 et TT-NEF. Les lipopeptides ont été purifiés partiellement lors d'une étape de précipitation par du diéthyléther froid dans 5 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique, puis lyophilisés. Les purifications ont été réalisées par plusieurs cycles parallèles de RP-HPLC : pour chaque cycle, 50 à 100 mg de lipopeptide brut ont été dissous dans 2ml de DMSO puis dilués dans 1 ml d'eau, avant injection sur :

-pour les monopalmitylpeptides, une colonne de dimension 12,5 mm x 250 mm chargée avec une phase stationnaire de type C18 (0,03, 5 µm) Hyperprep Hypersil éluée à 5ml/min.;

- pour les dipalmitoylpeptides: une colonne de 12,5 mm x 250 mm chargée avec du C3(0,03, 5 µm) Zorbax et éluée à 4ml/min.

Les composés ont été élués avec un système solvant acétonitrile/H₂O/0,05% de TFA à 60°C. L'homogénéité a été confirmée à l'aide d'une RP-HPLC sur deux colonnes analytiques différentes (une colonne Vydac C18 de 4,6 x 250 et une colonne C3 Zorbax de 4,6 x 150 mm): les lipopeptides étaient purs à plus de 90%. La caractérisation des peptides a été vérifiée en déterminant la composition en acides aminés après hydrolyse totale et détermination de la masse moléculaire par TOF-PDMS (Spectromètre de Mass à désorption par plasma, Bio-Ion 20, Uppsala, Suède). Les masses moléculaires mesurées ont été les suivantes: dérivés monopalmitoyle TT-GAG:[M+H]⁺ calc., 3534, obs. 3523; TT-NEF:[M+H]⁺ calc. 4317, obs.4318, TT-POL1:[M+H]⁺ calc. 3534, obs. 3535; TT-POL2: [M+H]⁺ calc. 4142, obs. 4143. Pour les dérivés dipalmitoyle TT-GAG: [M+H]⁺ cal. 3763, obs. 3762; TT-NEF:[M+H]⁺ calc. 4556, obs. 4553; TT-POL1:[M+H]⁺ calc. 3773, obs. nd; TT-POL2:[M+H]⁺ calc. 4380, obs. 4378. Tous les composés ont été obtenus sous forme de poudre lyophilisée. Les dérivés monopalmitoyle sont solubles dans l'eau. Les dérivés dipalmitoyles sont solubles dans un mélange eau-DMSO. Les rendements de purification ont été:

-pour les dérivés monopalmitoyles: TT-GAG: 16%, TT-NEF: 28%; TT-POL1: 33%; TT-POL2: 12%;

-pour les dérivés dipalmitoyles: TT-GAG: 16%; TT-NEF: 39%; TT-POL1: 22%; TT-POL2:4,5%.

Les séquences en acides aminés des peptides et lipopeptides sont présentées dans le tableau 8.

2) Souris et immunisation

On a utilisé des souris transgéniques HLA-A2 exprimant les domaines α1 et α2 de la molécule HLA-A2 (Vitiello et al., 1991, J. Exp. Med. Vol. 173, pages 1007-1015). Le domaine α3 de la chaîne lourde correspond au domaine murin H-2 K^b. Cette caractéristique permet à la

molécule de CD8⁺ exprimée par les cellules T murines CD8⁺ d'interagir avec le domaine $\alpha 3$ syngénique de la molécule MHC de classe I hybride.

Des souris transgéniques HLA-A3 ont également été utilisées.

5 Tous les peptides et lipopeptides ont été dissous dans une solution saline en présence de 10% de DMSO. L'induction de cellules T cytotoxiques chez les souris transgéniques HLA a été réalisée comme décrit par SETTE et al., (1994) (J. Immunol. vol. 153, pages 5586-5592).

10 En résumé, des épitopes CTL (50µmg/souris) ont été mélangés avec l'épitope T-auxiliaire TT 830-843 (140 µm/souris), émulsifiés dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) et injectés à la base de la queue. Les lipopeptides ont été injectés seuls (150 µm/souris), dilués dans une solution saline sans adjuvant incomplet de Freund (IFA). Onze
15 jours après l'injection, les souris ont été sacrifiées, et les splénocytes ainsi que les cellules des ganglions lymphatiques (LNC) ont été incubés à raison de 3×10^6 /ml dans du milieu complet en présence de lymphoblastes syngéniques stimulés par le LPS irradiés, et recouverts des peptides utilisés comme cellules stimulatrices. Le milieu complet
20 comprend du milieu RPMI 1640 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), 10% de SVF, 2mM de glutamine, des antibiotiques et du $\beta 2$ -mercaptoéthanol (5×10^{-5} M). Après six jours, les splénocytes et les cellules des ganglions lymphatiques ont été testés pour la sécrétion d'Interféron- γ selon la
25 technique ELISPOT décrite à l'exemple 3 pour les cellules de souris et la technique ELISPOT ci-dessous pour les PBMC humaines.

3. Test ELISPOT sur les PBMC humaines.

30 Des donneurs séropositifs pour HIV ont été sélectionnés pour leur expression en molécules HLA de classe I selon des données bien connues de l'homme du métier en matière de restriction vis-à-vis des peptides et lipopeptides.

35 Des microplaques de nitrocellulose (Millipore, Bedford, MA) ont été incubées pendant la nuit à 4°C avec 1 µg/ml d'un anticorps de

capture anti-Interféron- γ humain dilué dans un tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,6 (100 μ l/puits). Après cinq lavages, les plaques ont été saturées pendant 2 heures à 37°C avec 200 μ l puis lavées. Pour les cultures de cellules humaines, le milieu complet était composé de RPMI 1640, 10% de sérum albumine bovine, 2mM glutamine, d'antibiotiques et de β 2-mercaptoéthanol (5×10^{-5} M). Pour le test avec le peptide, des PBMC de patients ont été ajoutés directement dans les microplaques de nitrocellulose (2×10^5 cellules/puits) et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 10 mg/ml du peptide. Pour le test des lipopeptides, les PBMC ont été incubés pendant la nuit à 37 °C avec les lipopeptides, puis ont été lavés et irradiés (3000 rads). Ces cellules ont été utilisées comme cellules stimulatrices dans une co-culture (2×10^5 cellules par puits) avec des PBMC syngéniques (rapport 1/1) dans des plaques de nitrocellulose pendant 24 heures à 37°C. Après 24 heures, les plaques contenant la culture directe (peptide) ou la co-culture (lipopeptide) ont été lavées et incubées pendant 2 heures à la température du laboratoire en présence de 100 μ l d'un anticorps monoclonal anti-Interféron- γ de souris biotinylé dilué à 1 μ g/ml dans un tampon de PBS-Tween (0,05%) et de sérum albumine bovine (1%). Après 5 lavages dans du PBS-Tween à 0,05%, les plaques ont été incubées pendant 1 heure à la température du laboratoire en présence d'extravidine marquée à la phosphatase alcaline (Sigma, Allemagne) diluées au 1/5000 dans un tampon de PBS-Tween (0,05%) et de sérum de veau foetal (1% SVF). Les tâches (« spots ») ont été révélées en ajoutant un substrat conjugué chromogène de la phosphatase alcaline (Biorad, Hercules, CA) selon les instructions du fabricant et les cellules formant des tâches positives pour l'Interféron- γ ont été comptées à l'aide d'une loupe binoculaire.

30 **4. Test de prolifération**

Les cellules des ganglions lymphatiques et les splénocytes extraits ont été cultivées dans des microplaques de 96 puits à raison de 5.10^5 cellules par puits dans un volume final de 200 μ l de milieu complet. Les cellules ont été stimulées ou non avec 20 μ g/ml d'un épitope CD4

restreint aux molécules MHC de classe II, l'épitope TT 830-843. Après 72 heures de culture à 37°C, les cellules ont été incubées pendant la nuit avec 0,25 µCi de [³H] thymidine (Amersham, Life technologie). Les cellules ont été récupérées et l'incorporation de [³H] thymidine a été analysée dans un appareil «Microbetaplate » (Wallac, Turku, Finlande).

5. Cellules et anticorps monoclonaux

Des cellules Jurkat-A2 (J A2/K^b), une lignée de cellules T leucémiques humaines transfectées avec un plasmide codant la molécule hybride HLA-A2/H2K^b (Irvin et al. 1989).

Les lymphoblastes utilisés pour stimuler les cellules effectrices *in vitro* ont été préparés de la manière suivante: des splénocytes de souris transgéniques HLA-A2 ont été cultivés avec 25µg/ml de LPS (E. Coli) et 7 µg/ml de sulfate de Dextran (Sigma). Après 72 heures à 37°C, les cellules ont été lavées et incubées avec l'épitope CD8 pendant 2 heures à 37°C. Les cellules ont été ensuite irradiées (3000 rad) , lavées trois fois et co-cultivées avec les cellules effectrices.

Les anticorps monoclonaux de capture et de détection anti-Interféron-γ de souris (clones R4-6A2 et XMG1.2, respectivement) sont commercialisés par Pharmingen (San Diego, CA). Les anticorps monoclonaux de capture et de détection anti-Interféron-γ humain (clone 1-D1K et 7-B6-1-biotine, respectivement) sont commercialisés par Mabtech (Stockholm, Suède).

b). RESULTATS

1) Antigénicité des peptides et des lipopeptides chez l'homme.

On a testé la capacité des peptides sélectionnés comprenant les épitopes d'intérêt à stimuler efficacement les lymphocytes T-cytotoxiques spécifiques de donneurs séro-positifs pour HIV . L'activation des CTL spécifiques d'épitope a été suivie en mesurant la sécrétion d'Interféron-γ

après incubation des PBMC de patients avec les peptides, à l'aide du test ELISPOT. Lorsqu'il a été établi que les peptides stimulaient efficacement les CTL spécifiques, la capacité d'activation de ces CTL spécifiques d'épitopes a été étudiée avec les lipopeptides correspondants pré-incubés avec les PBMC syngéniques.

Les résultats présentés à la figure 6a montrent que les CTLs du patient Z77 (de type HLA-2; positif pour HIV) reconnaissent les peptides POL 476-484 et GAG 77-85. Les lipopeptides TT-POL1 et TT-GAG ont également fortement stimulé ces CTLs spécifiques. Aucune différence significative d'antigénicité entre les constructions monopalmitoyle et dipalmitoyle n'a pu être observée pour ces deux lipopeptides. Par ailleurs, aucune activation des CTL spécifiques de POL 346-354 dans les PBMC du patient Z77, que ce soit avec le peptide POL 346-354 ou encore avec les lipopeptides correspondant TT-POL2 (construction monopalmitoyle et dipalmitoyle). Cependant, comme indiqué à la figure 6a, les CTLs du patient HLA-A2 Z108 reconnaissent faiblement l'épitope 346-354 et plus fortement les lipopeptides TT-POL2.

Les résultats de la figure 6b démontrent que le peptide NEF 73-82, un épitope se fixant à la fois sur les molécules HLA-A11 et HLA-A3 et formant des complexes stables avec ces molécules, induit également une forte réponse CTL spécifique dans les PBMC des patients HLA-A11 et HLA-A3 (respectivement Z 129 et P48). De plus, le lipopeptide monopalmitoyle TT-NEF a également induit une forte réponse CTL à partir de ces PBMC.

Enfin, les résultats de la figure 6c montrent que tous les peptides sélectionnés pour leur capacité de fixation sur des molécules purifiées de HLA-B35 ainsi que pour leur capacité à former des complexes stables HLA/peptide (cf figure 6c), étaient très antigéniques chez le patient HLA-B35 (P3). Les lipopeptides monopalmitoyle et dipalmitoyle TT-NEF, comprenant les peptides NEF 74-81, NEF 71-79 et NEF 68-76 étaient également antigéniques chez le patient P3.

Cependant, les lipopeptides TT-POL2 (monopalmitoyle et dipalmitoyle), bien que contenant l'épitope POL-342-350 bien reconnu, n'étaient pas antigéniques chez les patients HLA-B35.

Les résultats de la figure 6c indiquent également que le peptide NEF 68-76 un épitope potentiel de HLA-B7, a induit efficacement une réponse CTL spécifique dans les PBMC du patient HLA-B7 Z118. De plus, les lipopeptides TT-NEF étaient aussi antigéniques chez les patients HLA-B7.

Il est important de souligner que les résultats des figures 6b et 6c montrent qu'un lipopeptide multiépitopique peut être efficacement reconnu par des individus exprimant différentes molécules HLA de classe I.

L'ensemble de ces résultats démontre clairement que les lipopeptides peuvent être efficacement transformés par les PBMC et peuvent activer les CTL spécifiques d'épitopes.

2. Etude de l'immunogénicité des peptides et des lipopeptides dans des souris transgéniques HLA-A2 et HLA-A3.

Le but de cette étude était de déterminer si les lipopeptides pouvaient induire la production de CTL spécifique dans des organismes naïfs, n'ayant jamais été sensibilisés avec un épitope HIV et ne possédant aucune cellule CTL spécifique d'épitope préexistante.

Les lipopeptides et peptides comprenant les épitopes d'intérêt ont été injectés à des souris transgéniques exprimant les molécules HLA-A2 ou HLA-A3. Les peptides porteurs d'épitopes T-cytotoxiques ont été co-injectés avec l'épitope T auxiliaire TT 830-843 et émulsifiés dans de l'adjuvant incomplet de Freund.

Les lipopeptides ont été dilués dans une solution saline et injectés sans adjuvant incomplet de Freund. La production de cellules CTLs spécifiques d'épitope dans ces souris a été suivie comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes.

Les résultats de la figure 7a montrent que les trois épitopes restreints à HLA-A2, respectivement GAG 77-85, POL 476-484 et POL 346-354, induisaient une faible réponse CTL spécifique dans les souris transgéniques HLA-A2, mais que les lipopeptides monopalmitoyle correspondant étaient capables d'induire une réponse CTL plus grande.

Dans tous les cas, les lipopeptides dipalmitoyle ont induit une réponse CTL plus faible que les lipopeptides monopalmitoyle.

Les résultats de la figure 7b indiquent que l'épitope NEF-73-82 induit une forte réponse CTL spécifique dans les souris transgéniques HLA-A3. De plus, les lipopeptides monopalmitoyles TT-NEF étaient capables d'induire une réponse CTL aussi élevée que l'épitope NEF 73-82.

3) Etude de la nécessité d'une réponse de type T-auxiliaire pour l'induction de cellules CTLs.

Afin de déterminer l'importance de l'effet T-auxiliaire dans la production de cellules CTLs par les lipopeptides selon l'invention, des lipopeptides monopalmitoyle comprenant un épitope HIV mais dépourvus de l'épitope TT 831-843 ont été construits.

Les résultats de la figure 8a, montrent que le lipopeptide POL1 dépourvu d'épitope T-auxiliaire n'induit aucune réponse CTL spécifique, alors que le lipopeptide TT-POL1 était capable d'induire une réponse CTL spécifique beaucoup plus grande. Ce résultat indique que le peptide T auxiliaire est nécessaire afin d'induire une forte réponse CTL lorsque les lipopeptides sont injectés à la base de la queue de souris transgéniques HLA-A2. Des expériences de prolifération lymphocytaire ont été réalisées afin de déterminer si l'épitope T-auxiliaire TT 831-843, inclu dans les lipopeptides, était capable d'induire efficacement une réponse T-auxiliaire.

Les résultats présentés à la figure 8b démontrent que les cellules de ganglions lymphatiques des souris immunisées avec le lipopeptide monopalmitoyle TT-POL1 proliféraient en réponse aux peptides TT 830-843 aussi fortement que les cellules des ganglions lymphatiques de souris immunisées avec l'épitope T-auxiliaire TT 830-843 émulsifiées dans l'adjuvant incomplet de Freund.

Ces résultats démontrent qu'une réponse de type T-auxiliaire est nécessaire afin d'obtenir une forte réponse CTL spécifique, et que la réponse T-auxiliaire est induite par l'épitope T auxiliaire contenu dans les constructions co-linéaires lipopeptidiques.

TABLEAU 1: Epitopes de BCR-ABL

Peptide	Séquence	Fixation au HLA
247-255	EDAELNPRF	B44
488-496	SELDLEKGL	B44
768-776	DELEAVPNI	B44
901-934 b2a2	KEDALQRPV	B44
902-935 b2a2	EDALQRPVA	B44
986-994	GEKLRVLGY	B44
1176-1184	EDTMEVEEF	B44
1252-1260	MEYLEKKNF	B44
1691-1699	NEEADEVF	B44
49-57	VNQERFRMI	B8
580-588	LFQKLASQL	B8
722-730	ARKLRHVFL	B8
786-794	ALKIKISQI	B8
886-893	CVKLQTVH	B8
928-936 b3a2	KALQRPVAS	B8
1830-1838	GAKTKATSL	B8
1975-1983	IQQMRNKFA	B8
1977-1984	QMRNKFAF	B8
252-260	NPRFLKDNL	B7
329-338	TPDCSSNENL	B7
693-701	TPRRQSMTV	B7
1058-1066	SPGQRSISL	B7
1196-1205	HPNLVQLLGV	B7
1560-1569	SPKPSNGAGV	B7
1717-1725	KPLRRQVTV	B7
1878-1884	SPAPVPSTL	B7
36-44	ERCKASIRR	B27
71-79	DRQRWGGFFRR	B27
575-583	QRVGDLFQK	B27

TABLEAU 1: Epitopes de BCR-ABL

Peptide	Séquence	Fixation au HLA
834-842	FRVHSRNGK	B2/
642-650	LLYKPVDVR	A2
684-692	FLSSINEEI	A2
708-716	QLLKDSFMV	A2
714-722	FMVELVEGA	A2
817-825	KLSEQESLL	A2
881-889	MLTNŠCVKL	A2
908-917	GLYGFLNVIV	A2
912-920	FLNVIVHSA	A2
1240-1248	VLLYMATQI	A2
1903-1911	FIPLISTRV	A2
1932-1940	VVLDSTEAL	A2
50-58	NQERFRMIY	A1
223-231	VGDASRPPY	A1
549-558	KVPELYEIHK	A3/A11
583-591	KLASQLGVY	A3/A11
715-724	MVELVEGARK	A3/A11
916-923	IVHSATGFK	A3/A11
920-928 b3a2	ATGFKQSSK	A3/A11
924-932 b3a2	KQSSKALQR	A3/A11
1156-1165	EVYEGVVKKY	A3/A11
1311-1320	SLAYNKFSIK	A3/A11
1499-1509	NLFSALIKK	A3/A11
1724-1734	TVAPASGLPHK	A3/A11
1905-1914	LISTRVSLRK	A3/A11
1922-1930	RIASGAITK	A3/A11

TABLEAU 2 - Epitopes de la p53

	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A1:</u>
5	RVEGNLARVEY (196-205)
	GSDCTTIHY (226-234)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A2:</u>
	LLPENNVLSP (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
10	RMPEAAPRV
	ALNKMFCQL (129-137)
	STPPPGTRV (149-157)
	GLAPPQHLIRV (187-197)
	LLGRNSFEV (264-272)
15	PLDGEYFTL (322-330)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A3:</u>
	RVRAMAIYK (156-164)
	RRTEENLR (282-290)
	ELPPGSTKR (298-306)
20	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B7:</u>
	LPENNVLSP (26-35)
	APRMPEAAPPV (63-73)
	APRMPEAAPRV
	APPQHLIRV (189-197)
25	RPILTIITL (249-257)
	KPLDGETYFTL (321-330)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B8:</u>
	CQLAKTCPV (135-143)
	GLAPPQHLL (187-195)
30	NTRHSHVVV (210-218)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B51:</u>
	LLPENNVLSP (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
35	LIRVEGNLRV (194-203)

TABLEAU 3Epitopes des protéines E₆ et E₇

5	YMLDLQPETT (E7 11-20)
	LLMGTLGIV (E7 82-90)
	TLGIVCPI (E7 86-93)
	TIHDIILECV (E6 29-38)
	KLPQLCTEL (E6 18-26)
10	RPPKLPQL (E6 8-15)
	LRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPY (E6 45-67)
	ISEYRHYCY (E6 80-88)
	EKQRHLDKKQRFHNIRGRWT (E6 121-140)
	GQAEPDRAHYNIVTF (E7 43-57)
15	QAEPDRAHY (E7 44-52)
	EPDRAHYNIV (E7 46-55)

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1HLA-A1

Qnef 96-106: GLEGLIHSQRR
 Qnef 121-128: FPDWQNYT
 Qnef 137-145: LTFGWQCYKL
 Qnef 184-191: RFDSRLAF
 Qnef 195-202: ARELHPEY

HLA-A2

Gp120 121-129: KLTPLCVTL
 P17 77-85: SLYNTVATL
 RT 200-208: ALVEICTEM
 RT 275-285: VLDVGDAYFSV
 RT 346-354: KNYQYMDDL
 RT 368-376: KIEELRQHL
 RT 376-387: LLRWGLTTPDK
 RT 476-484: ILKEPVHGV
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 RT 633-692: ELVNQDEQL
 Nef 136-145: PLTFGWCFKL
 Nef 180-189: VLOWRFDSRL
 Nef 190-198: ALHHVAREL
 Gp41 818-826: SLLNATVDI
 P24 185-193: DLNTMLNTV
 RT 346-354: VNYQYMDDL
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 Pro 143-152: VLVGPTPNI
 (Gp120 37-44: TVYGVFPV
 (Gp120 115-122: SLKPCVKL
 (Gp120 313-321: RIQRGPGR
 (Gp120 197-205: TLTSNTSV
 (Gp120 426-435: FINMWQEV
 (Gp41 836-844: VVQGAYRAI
 (p24 219-228: HAGPIAPGQM
 (p15 422-431: QMKDCTERQA
 (p15 448-456: FLQSRPETA
 (RT 681-691: ESELVNQIEG

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1 (suite)HLA-A3

P17 18-26: KIRLRPGGK
P17 20-28: RLRPGGKKK
RT 200-210: ALVEICTEMEK
RT 325-333: AJFQSSMTK
RT 355-365: DLEIGQHRTK
Nef 73-82: QVPLRPMTYK
Gp120 37-46: TVYGVVPVWK
Gp41 775-785: RLRDLLLIVTR
P17 18-26: KIRLRPGGK

HLA-A11

RT 325-333: AJFQSSMTK
RT 507-517: QYQEPFKNLK
Nef 73-82: QVPLRPMTYK
Nef 84-92: AVDLSHFLK
p24 349-359: ACQVGGPGHK
P17 83-91: ATLYCVHQR

HLA-A24 (A9)

Gp120 52-61: LFCASDAKAY
Gp41 591-598: YLKDQQLL
ou 590-597: RYLKDQQLL
(RT 484-492: VYYDPSKDL
(RT 508-516: IYQEPFKNL
(RT 681-691: ESELVQIIEG

HLA-A25 (A10)

P24 203-212: ETINEEAAEV

HLA-A26 (A10)

P24 167-175: EVTPMFSAL

HLA-A30 (A19)

(Gp41 845-852: RAIRHIPRR

HLA-A31 (A19)

Gp41 775-785: RLRDLLLIVTR

HLA-A32 (A19)

Gp120 424-432: RIKQIINMW
Gp41 774-785: HRLRDLILI
RT 559-565: PIQKETWETV

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1 (Suite)HLA-A33 (A19)

(P24 266-275: IILGLNKIVR

HLA-B7

RT 699-707: YLAWVPAHK
Nef 68-77: FPVTQVPLR
Nef 128-137: TFGPGVRYPL
Gp120 303-312: RPNNTTRKSI
Gp41 848-856: IPRRIRQGL
RT 699-707: YLAWVPAHK

HLA-B8

Gp120 2-10: RVKEKYQHL
P17 24-32: GGKKKYKLK
Nef 90-97: FLKEKGGL
P24 259-267: GENYKRWI
Gp41 591-598: YLKDQQLL
(Gp41 849-856: PRRIRQGL
ou 851-859: RIRQGLERIL
(P24 329-337: DCKTILKAL
(RT 185-193: GPKVKQWPL
(Nef 182-189: EWRFD SRL

HLA-B14

Gp41 589-597: ERYLKDQQL
P24 298-306: DRFYKTLRA
(P24 183-191 ? : DLNTMLNTV
(p24 304-313: LRAEQASVQEV
(p24 305-313: RAEQASVQEV

HLA-B18

Nef 135-143: YPLTFGWCY
Nef 135-143: YPLTFGWCF

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1HLA-B27

P24 263-272: KRWTLGLNK
Nef 73-82: QVPLRPMTYK
Nef 134-141: RYPLTFGW
ou 133-141: YPLTFGW
Gp41 589-597: ERYLKDQQL
(Gp41 791-800: GRRGWEALKY)

HLA-B35

Gp120 78-86: DPNPQEVVL
Gp120 257-265: RPVVSTQLL
RT 285-294: VPLDKDFRKY
RT 323-331: SPAIFQSSM
RT 342-350: NPDIVTYQY (consensus clade B)
RT 460-468: IPLTEEAEL
RT 598-608: EPIVGAETFY
Nef 68-76: FPVRPQVPL
Nef 74-81: VPLRPMY
Gp41 611-619: TAVPWNASW
Gp120 42-52: VPPVWKEATTTL
P17 124-132: NSSQVSQNY (consensus clade B)
P24 254-262: PPIPVGEIY (consensus clade B)

HLA-B37

Nef 120-128: YFPDWQNYT

HLA-B44 (B12)

P24 175-186: SEGATPQDL
(P24 175-184: LESGATPQDL)

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1HLA-B51 (B5)

gp11 562-570: RAIEAQQHL
RT 200-208: ALVEICTEM
RT 209-217: EKEGKISKI
RT 295-302: TAFIPSI

HLA-B52 (B5)

Nef 190-198: AFHHVAREL

HLA-B55 (B22)

Gp120 42-51: VPVWKEATTTL

HLA-B57 et B58 (B17)

P24 240-249: TSLTQEIQGW
Nef 116-125: HTQGYFPDWQ
ou 116-124: HTQGYFPDW
Nef 120-128: YFPDWQN
(P24 147-155: ISPRTLNAW
(P24 164-172: FSPEVIPMF

HLA-Bw62 (B15)

P17 20-29: RLPGGKKKY
P24 268-277: LGLNKIVRMV
RT 427-438: LVGKLNWASQIY
Nef 84-91: AVDLSHFL
Nef 117-127: TQGYFPDWQNY

HLA-Cw4

gp120 380-388: SFNCGGEFF

HLA-Cw8

RT 663-672: VTDSQYALGI
P24 305-313: RAEQASQEV
Nef 82-91: KAALDLSHFL

HLA-Cw7

P24 308-316: QATQEVKNV

TABLEAU 5 - Epitopes de Mélanome humain

Gene/protéine	MHC restriction	Peptide	Position des acides aminés
Tyrosinase	HLA-A2	MLLAVLYCL	1-9
	HLA-A2	YMNGTMSQV	369-377
		YMDGTMSQV	
	HLA-A24	AFLPWHRLF	206-214
	HLA-B44	SEIWRDIDF	192-200
Pmel17 ^{gp100}	HLA-A2	KTWGQYWQV	154-162
	HLA-A2	AMLGHTTMEV	177-186
	HLA-A2	MLGHTTMEV	178-186
	HLA-A2	ITDQVPFSV	209-217
	HLA-A2	YLEPGPVT A	280-288
	HLA-A2	LLDGTATLRL	457-466
	HLA-A2	VLYRYGSFSV	476-485
	HLA-A2	SLADTNSLAV	570-579
	HLA-A3	ALLAVGATK	17-25
Melan-A ^{MART-1}	HLA-A2	(E)AAGIGILTV	26(7)-35
	HLA-A2	ILTVILGVL	32-40
gp ^{75TRP-1}	HLA-A31	MSLQRQFLR	
TRP-2	HLA-A31	LLGPGRPYR	197-205

TABLEAU 6: Epitopes de tumeurs résultant de mutations

Gene/proteine	Tumeur	MHC Restriction	Peptide	Position des acides aminés
MUM-1	Mélanome	HLA-B44	EEKLIVVLF	30-38
CDK4	Mélanome	HLA-A2	ACDPHSGHFV	23-32
β -catenine	Mélanome	HLA-A24	SYLDSGIHF	29-37
CASP-8	carcinome squameux de la tête et du cou	HLA-B35	FPSDSWCYF	476-484

TABLEAU 7**Antigènes communs à diverses tumeurs**

Gene	tissu où a lieu l'expression normale	MHC restriction	Peptide antigénique	Position des acides aminés
MAGE-1	testicules	HLA-A1	EADPTGHSY	161-169
		HLA-Cw16	SAYGEPRKL	230-238
MAGE-3	testicules	HLA-A1	EVDPIGHLY	168-176
		HLA-A2	FLWGPRALV	271-279
		HLA-B44	MEVDPIGHLY	167-176
BAGE	testicules	HLA-Cw16	AARAVFLAL	2-10
GAGE-1/2	testicules	HLA-Cw6	YRPRPRRY	9-16
RAGE-1	rétine	HLA-B7	SPSSNRIRNT	11-20
GnTV	aucun	HLA-A2	VLPDVFIRC	38-64

TABLEAU 8 : Peptides et lipopeptides utilisés

Désignation	Position	Séquences d'acides aminés	MHC-I restriction	Référence
peptides HIV				
GAG	77-85	SLYNTVATL	HLA-A2.01	(6)
POL	476-484	ILKEPVHGV	HLA-A2.01	(5)
POL	346-354	VIYQYMDL	HLA-A2.01	(2)
POL	342-350	NPDIYIYQY	HLA-B35	(4)
POL	343-350	PDVIYQY	HLA-B44	non décrit
POL	347-354	FYQYMDL	HLA-A24	non décrit
POL	345-354	VIYQYMDL	HLA-A2	non décrit
NEF	68-76	FPVTPQVPL	HLA-B7-B35	(3)
NEF	71-79	TPQVPLRPM*	HLA-B35	non décrit
NEF	74-81	VPLRPMY	HLA-B35	(1)
NEF	73-82	QVPLRPMYK	HLA-A3, -A11	(1)
Lipopeptides HIV				
TT-GAG	77-85	Palm-K-GR QYIKANSKFIGITE RGR SLYNTVATL	HLA-A2.01	
TT-POL1	476-484	Palm-K-GR QYIKANSKFIGITE RGR ILKEPVHGV	HLA-A2.01	
TT-POL2	multiépitope	Palm-K-GR QYIKANSKFIGITE RGR NPDI VIYQYMDL	multi HLA	
TT-NEF	multiépitope	Palm-K-GR QYIKANSKFIGITE RGR FVTP QVPLRPMYK	multi HLA	
Peptide T auxiliaire				
Toxine tétanique	830-843	QYIKANSKFIGITE	HLA-DR, H-2 K ^b	

REFERENCES DU TABLEAU 8:

- CULMANN-PENCIOLELLI, B., S. LAMHAMEDI-CHERRADI, I. COUILLIN, N. GUEGAN, J.P. LEVY, J.G. GUILLET, and E. GOMARD.
5 1994. Identification of multirestricted immunodominant regions recognized by cytolytic T lymphocytes in the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein [published erratum appears in J. Virol. 1995 Jan: 69 (1):618]. J. Virol. 68:p7336-43.
- HARRER, E., T. HARRER, P. BARBOSA, M. FEINBERG, R.P. JOHNSON, S. BUCHBINDER, and B.D. WALKER. 1996. Recognition
10 of the highly conserved YMDD region in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by HLA-A2- restricted cytotoxic T lymphocytes from an asymptomatic long-term nonprogressor. J. Infect
15 Dis. 173: p476-9.
- LUCCHIARI-HARTZ, M., M. BAUER, G. NIEDERMANN, B. MAIER, A. MEYERHANS, and K. ELCHMANN. 1996. Human immune
20 response to HIV-1 Nef. II. Induction of HIV-1/HIV-2 Nef cross-reactive cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood lymphocytes of non-infected healthy individuals. Int Immunol. 8:p577-84.
- ROWLAND-JONES, S., J. SUTTON, K. ARIYOSHI, T. DONG, F. GOTCH, S. McADAM, D. WHITBY, S. SABALLY, A. GALLIMORE, T. CORRAH et al. 1995. HIV specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but
25 uninfected Gambian women. Nat Med. 1:59-64.
- TSOMIDES, T.J. B.D. WALKER, and H.N. EISEN. 1991. An
30 optimal viral peptide recognized by CD8⁺ T cells binds very tightly to the restricting class I major histocompatibility complex protein on intact cells but not to the purified class I protein. Proc. Natl Acad. Sci USA. 88:p11276-80.

- WALKER, B.D. C. FLEXNER, K. BIRCH-LIMBERGER, L. FISHER, T.J. PARADIS, A. ALDOVINI, R. YOUNG, B. MOSS, and R. T.SCHOOLEY. 1989. Long-term culture and fine specificity of human cytotoxic T-lymphocyte clones reactive with human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl acad Sci USA. 86:p9514-8.

REVENDECATIONS

1. Lipopeptide comprenant au moins un épitope T auxiliaire, au moins un épitope CTL et au moins un résidu lipidique, caractérisé en ce que les épitopes et la partie lipidique d'une part, et les épitopes d'autre
5 part, sont séparés indépendamment par des séquences d'acides aminés, appelées espaceurs, comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie du lipopeptide.

2. Lipopeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que les
10 espaceurs sont globalement hydrophiles et présentent entre 1 et 10 acides aminés.

3. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'au moins l'un des espaceurs comprend entre 1 et 10, glycines et/ou arginines.

15 4. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'au moins l'un des espaceurs présente l'une des séquences suivantes:

GLY ARG

20 ou **ARG GLY ARG**.

5. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'au moins l'un des espaceurs comprend un ou plusieurs acides glutamique et/ou acides aspartique.

25 6. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les espaceurs intègrent une cystéine ou une chaîne alkyle fonctionnalisée par un groupe thiol et des liaisons non-peptidiques, telles que des liaisons disulfure ou dithioéther.

7. Lipopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les espaceurs comprennent un groupe tel qu'un
30 groupe thiazolidine, oxime ou hydrazone.

8. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'enchaînement :

- d'une partie lipidique,
- d'un premier espaceur,
- 35 - d'un épitope T auxiliaire;

- d'un second espaceur, et
- d'un épitope CTL.

9. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'enchaînement :

- 5 - d'une partie lipidique,
- d'un premier espaceur,
- d'un épitope T auxiliaire,
- d'un second espaceur,
- d'un premier épitope CTL,
- 10 - d'un troisième espaceur, et
- d'un second épitope CTL.

10. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C₁₀ à C₂₀, éventuellement ramifiées

15 ou insaturées, ou un dérivé de stéroïde.

11. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend au moins deux chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C₁₀ à C₂₀, liées entre elles par un ou plusieurs acides aminés.

20 12. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la partie lipidique est constituée de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH₂ d'une lysine.

25 13. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend un résidu d'acide palmitique, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linoléique, d'acide 2-amino hexadécanoïque, de pimélaute ou de trimélaute.

14. Lipopeptide, selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la partie non lipidique comprend entre 15 et 100 acides aminés.

30 15. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est un épitope multivalent.

16. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est le peptide 830-843 de la toxine tétanique présentant la séquence suivante:

QYIKANSKFIGITE

17. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est l'épitope de l'hémagglutinine ou l'épitope PADRE.

18. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il contient au moins un épitope CTL d'une protéine spécifique du mélanome, d'une protéine du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la protéine p-53 ou d'une protéine du stade intra-hépatocytaire de *Plasmodium Falciparum*.

19. Utilisation d'un lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 18 pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique.

20. Utilisation d'un lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 18 pour la fabrication d'un médicament pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la p-53 du mélanome, ou de la malaria.

21. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient une dose pharmacologiquement efficace d'un ou plusieurs lipopeptides selon l'une des revendications 1 à 18 et des excipients pharmaceutiquement compatibles.

22. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il contient un ou plusieurs lipopeptides selon l'une des revendications 1 à 18.

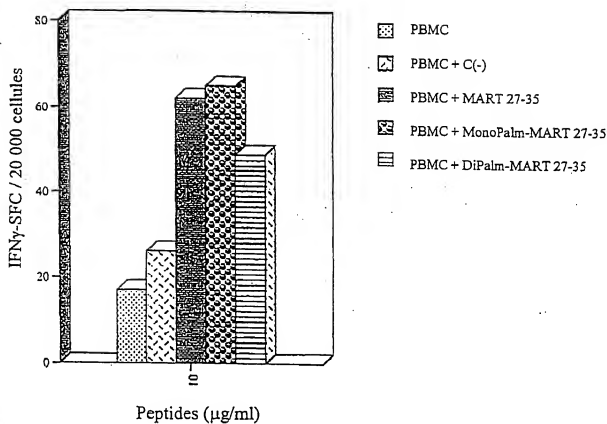


FIGURE 1

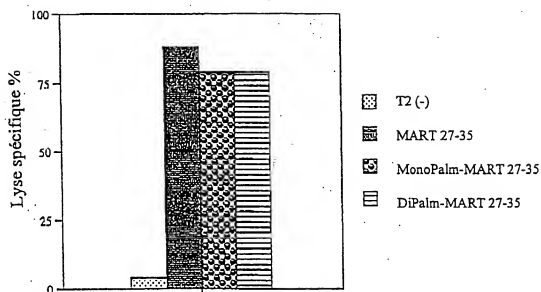


FIGURE 2A

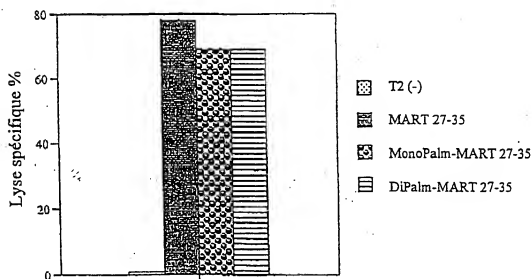


FIGURE 2B

3/12

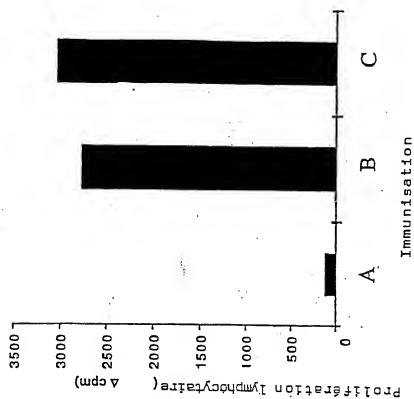


Figure 3b

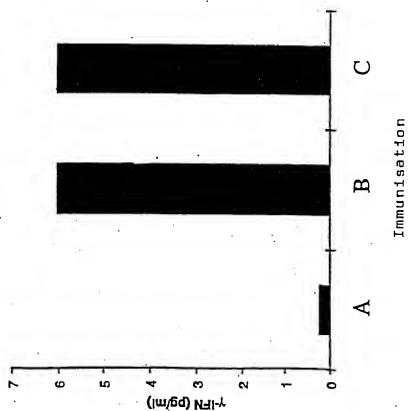


Figure 3a

4/12

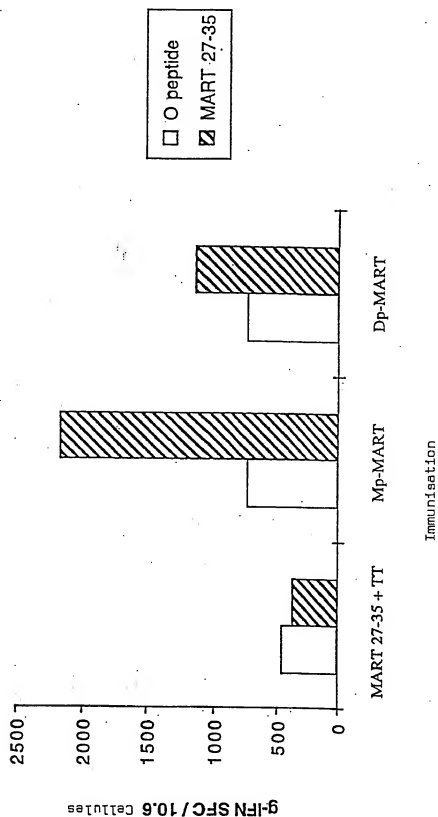


Fig. 4

5/12

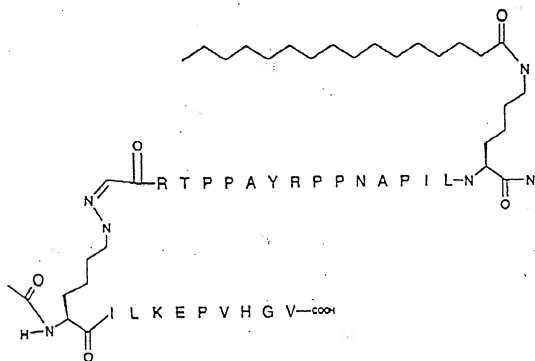
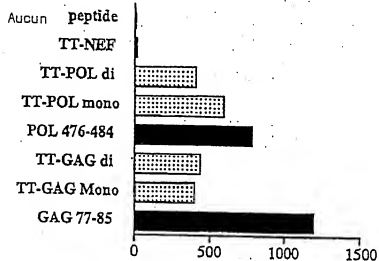


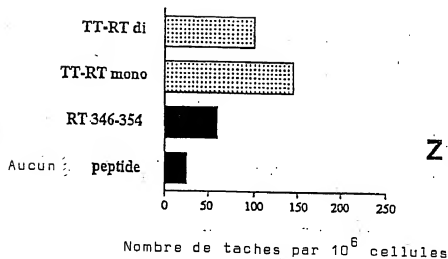
FIGURE 5

6/12

HLA-A2



Z 77

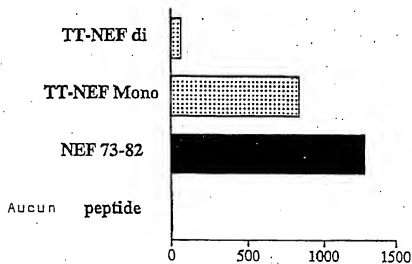


Z 108

Figure 6a

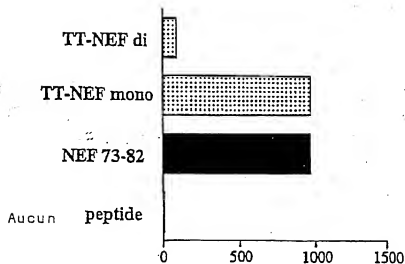
7/12

HLA-A11



Z 129

HLA-A3



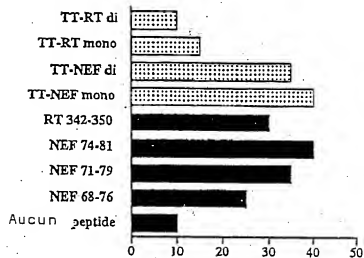
P 48

Nombre de taches par 10^6 cellules

Figure 6b

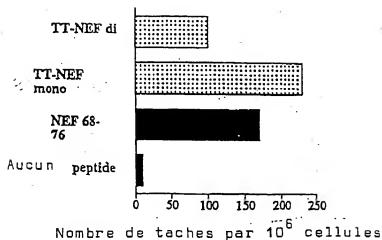
8/12

HLA-B35



P 3

HLA-B7



Z 118

Figure 8c

9/12

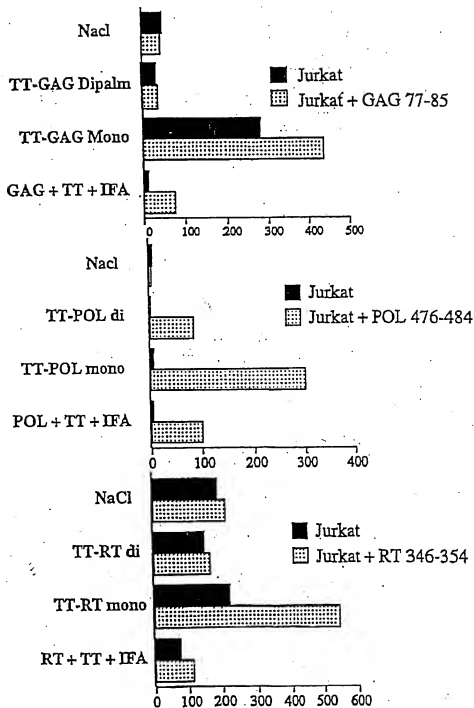
Nombre de taches par 10^6 cellules

Figure 7a

10/12

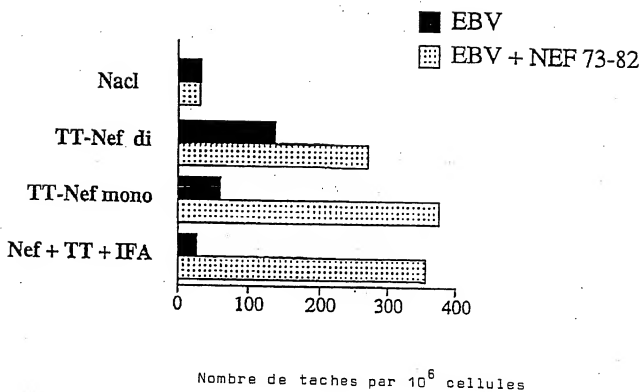


Figure 7b

11/12

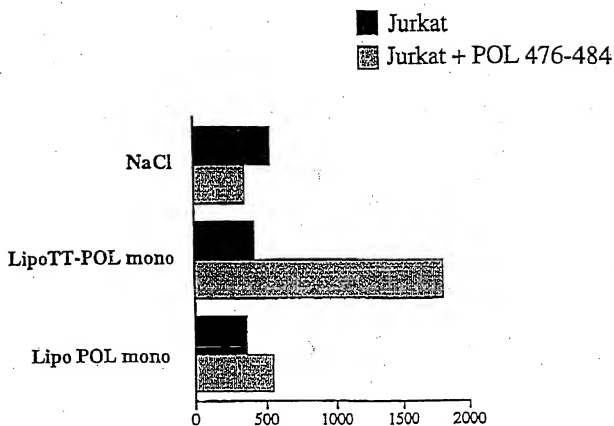
Nombre de taches par 10^6 cellules

Figure 8a

12/12

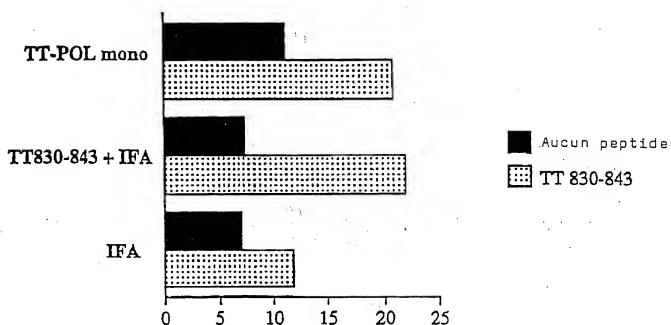
Incorporation de ^3H thymidine (x 10^{-3} cpm)

Figure 6b

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

by fax and post

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

PCT

16 JUIL 2000

Destinataire:

MICHELET, Alain
CABINET HARLE & PHELIP
7, rue de Madrid
75008 PARIS
FRANCE

505

FAX NO: 33 1 53 04 64 00

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 13.07.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
1691 PCT 374

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/00792

Date du dépôt international (jour/mois/année)
06/04/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
07/04/1998

Déposant
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET ... et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.

2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.

3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen
préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Büchler, S

Tél. +49 89 2399-8090




TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1691 PCT 374		POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/PEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/00792	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/04/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 07/04/1998	
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K14/025			
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET ... et al.			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 3 feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 25/10/1999		Date d'achèvement du présent rapport 13.07.2000	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé Steffen, P N° de téléphone +49 89 2399 7307	



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00792

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-44 version initiale

Revendications, N°:

1-21 reçue(s) le 19/05/2000 avec la lettre du 16/05/2000

Dessins, feuilles:

1/12-12/12 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☒ des revendications, n° : 22
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00792

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 3,5,6
	Non : Revendications 1,2,4,7-21
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-21
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-21
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

Concernant le point I

Base du rapport

Les modifications apportés aux anciennes revendications 1-22 respectent les critères de l'article 34(2)(b) PCT. Le présent rapport est donc établi sur la base des nouvelles revendications 1-21.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 95 22317 A
- D2: VITIELLO A ET AL: 'Development of a lipopeptide -based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans' JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 1, janvier 1995, pages 341-349.
- D3: J.P. SAUZET ET AL: 'Long lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced in vivo with chimeric-multirestricted lipopeptides' VACCINE, vol. 13, no. 14, 1995, pages 1339-1345.
- D4: US 5 637 481 A

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33 (2) PCT, l'objet des revendications 1, 2, 4 et 7-21 n'étant pas conforme au critère de nouveauté comme suit.

La nouveauté des lipopeptides des revendications 1, 2, 7, 9 et 13, est anticipée dans les documents D1 (entre autres, Exemple 7, page 56 et Exemple 9, pages 59 et 60); D2 (page 345, Figure 1) et D3 (Tableau 1, Lipo-NP123, page 1344). L'objet des revendications 4 et 8 est révélé dans D3 (Tableau 1, Lipo-NP123, page 1344), celui des revendications 10-12, 14, 15 et 17 dans D1 (entre autres, Exemple 7, page 56 et Exemple 9, pages 59 et 60) et D2 (page 345, Figure 1) et finalement celui de la revendication 16 dans D1 (page 29, ligne 15-16). Il est à noter que ces objections sont le résultat direct d'une définition peu claire

et trop ouverte des lipopeptides des revendications 1 et 2 et dont sera fait état en détail au point VIII de la présente communication. L'utilisation ainsi que la composition et le vaccin des revendications 18, 20 et 21, qui dépendent des revendications 1-17 est connue de part D1 (Exemple 9, pages 59-62), D2 (section Results, page 343, colonne de droite-page 346) et D3 (page 1341, colonne de droite-page 1342). L'utilisation selon la revendication 19 a été révélée dans D1 (Exemple 9, pages 59-62) et D2 (section Results, page 343, colonne de droite-page 346).

En résumé, l'objet des revendications 1, 2, 4, 7-21 n'est pas nouveau, contrairement aux exigences de l'article 33(2) PCT, et en conséquence ces revendications manquent également d'activité inventive selon l'article 33(3) PCT.

D'une manière plus générale, l'objet des revendications 1-21 ne remplit pas les critères d'activité inventive selon l'article 33(3) PCT pour les raisons suivantes.

La présente demande a pour objet la provision de lipopeptides qui comprennent des épitopes T auxiliaires, des épitopes CTL, une partie lipidique et des séquences espaceurs entre ces différentes parties, avec des variations possibles dans les épitopes et les espaceurs et les parties lipidiques. De plus sont revendiqués des compositions/vaccins et des utilisations vaccinales basées sur ces peptides. Le document D1 révèle un certain nombre de lipopeptides différents qui comprennent différents épitopes T auxiliaires, différents épitopes CTL, une partie lipidique ainsi des séquences espaceurs entre ces différentes parties ainsi que la formulation et l'utilisation de ces lipopeptides comme vaccins. Le document D1 est donc considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet des revendications 1-22. L'objet des dites revendications ne se distingue de cet état de la technique que par l'utilisation d'espaceurs différents. Selon les demandeurs, le problème technique consistait à augmenter la solubilité des lipopeptides dans un tampon aqueux e.g. **réduire l'hydrophobicité des lipopeptides**, pour des raisons de stérilisation et de caractérisation du produit (description, page 2, lignes 5-19). Il est à noter ici que si les demandeurs reconnaissent que "le problème à résoudre **consistait donc** à réduire l'hydrophobicité des lipopeptides" (description, page 2, ligne 16; e.g. à augmenter l'hydrophilicité des lipopeptides), il faut assumer que le problème technique a été en tant que tel apparent à l'homme de métier.

La solution proposée était, tout en maintenant une structure globale identique à celle des

lipopeptides de D1, de changer les résidus des espaceurs utilisés dans D1, par des espaceurs contenant des résidus chargés plus hydrophiles. Cette solution ne peut être considérée comme inventive pour les raisons suivantes. Les lipopeptides en question se composent de trois parties reliées par lesdits espaceurs: une partie lipidique, un épitope HTL et un épitope CTL. Si l'homme de métier voulait augmenter l'hydrophilie e.g. réduire l'hydrophobicité des dits lipopeptides, il ne peut ni modifier la partie lipidique, car elle doit rester lipidique et restera donc hydrophobe, ni les séquences des épitopes HTL et CTL, car elles sont préfixées par le système immunitaire et donc *a fortiori* pour le but vaccinal à suivre. Il ne lui reste donc que la possibilité pour augmenter l'hydrophilicité de la molécule de changer les séquences des espaceurs, afin de rendre ceux-ci plus hydrophiles. Or il est bien connu par l'homme de métier que la substitution dans une séquence d'acides aminés de résidus neutres et/ou hydrophobes par des résidus chargés augmente l'hydrophilicité et par la même réduit l'hydrophobicité de ladite séquence. Ceci est exemplifié entre autre dans D4 (colonne 17, lignes 56 à 62). Il apparaît donc que la solution proposée en réponse au problème technique, tel qu'il est formulé par les demandeurs, n'est pas inventive.

En conséquence, les lipopeptides des revendications 1-17 ne peuvent être considérés comme étant basé sur une activité inventive ni de même les spécifications évidentes des revendications 18-21, qui sont toutes basées sur lesdits lipopeptides des revendications 1-17, contrairement aux exigences de l'article 33(3) PCT.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

Les objections suivantes concernent l'article 6 PCT (clarté).

La revendication 1 manque de clarté par rapport à "comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie du lipopeptide". Cette expression ne permet ni d'apprécier combien d'acides aminés chargés et dans quel enchaînement doivent être dans la molécule du lipopeptide pour assurer l'hydrophilie. Aussi et surtout, l'homme de métier se saurait évaluer clairement quel degré d'hydrophilie (en fait solubilité dans l'eau) doit être atteint par lesdits lipopeptides et en conséquent il ne saurait distinguer les lipopeptides qui tombent sous l'étendue de la

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/00792

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

revendication. Finalement il ne ressort pas clairement de la revendication 1 si seulement un des espaceurs doit être composé d'acides aminés chargés en milieu neutre ou si ceci est également requis pour le deuxième en même temps.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS


PCT

REC'D 18 JUL 2000

WFO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1691 PCT 374	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/00792	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/04/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 07/04/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K14/025		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET ... et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 3 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 25/10/1999	Date d'achèvement du présent rapport 13.07.2000	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Steffen, P N° de téléphone +49 89 2399 7307	



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00792

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après *(les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.)* :

Description, pages:

1-44 version initiale

Revendications, N°:

1-21 reçue(s) le 19/05/2000 avec la lettre du 16/05/2000

Dessins, feuilles:

1/12-12/12 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☒ des revendications, n° : 22
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/00792

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 3,5,6
	Non : Revendications 1,2,4,7-21
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-21
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-21
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

Concernant le point I**Base du rapport**

Les modifications apportés aux anciennes revendications 1-22 respectent les critères de l'article 34(2)(b) PCT. Le présent rapport est donc établi sur la base des nouvelles revendications 1-21.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 95 22317 A
- D2: VITIELLO A ET AL: 'Development of a lipopeptide -based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans' JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 1, janvier 1995, pages 341-349.
- D3: J.P. SAUZET ET AL: 'Long lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced in vivo with chimeric-multirestricted lipopeptides' VACCINE, vol. 13, no. 14, 1995, pages 1339-1345.
- D4: US 5 637 481 A

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33 (2) PCT, l'objet des revendications 1, 2, 4 et 7-21 n'étant pas conforme au critère de nouveauté comme suit.

La nouveauté des lipopeptides des revendications 1, 2, 7, 9 et 13, est anticipée dans les documents D1 (entre autres, Exemple 7, page 56 et Exemple 9, pages 59 et 60); D2 (page 345, Figure 1) et D3 (Tableau 1, Lipo-NP123, page 1344). L'objet des revendications 4 et 8 est révélé dans D3 (Tableau 1, Lipo-NP123, page 1344), celui des revendications 10-12, 14, 15 et 17 dans D1 (entre autres, Exemple 7, page 56 et Exemple 9, pages 59 et 60) et D2 (page 345, Figure 1) et finalement celui de la revendication 16 dans D1 (page 29, ligne 15-16). Il est à noter que ces objections sont le résultat direct d'une définition peu claire

et trop ouverte des lipopeptides des revendications 1 et 2 et dont sera fait état en détail au point VIII de la présente communication. L'utilisation ainsi que la composition et le vaccin des revendications 18, 20 et 21, qui dépendent des revendications 1-17 est connue de part D1 (Exemple 9, pages 59-62), D2 (section Results, page 343, colonne de droite-page 346) et D3 (page 1341, colonne de droite-page 1342). L'utilisation selon la revendication 19 a été révélée dans D1 (Exemple 9, pages 59-62) et D2 (section Results, page 343, colonne de droite-page 346).

En résumé, l'objet des revendications 1, 2, 4, 7-21 n'est pas nouveau, contrairement aux exigences de l'article 33(2) PCT, et en conséquence ces revendications manquent également d'activité inventive selon l'article 33(3) PCT.

D'une manière plus générale, l'objet des revendications 1-21 ne remplit pas les critères d'activité inventive selon l'article 33(3) PCT pour les raisons suivantes.

La présente demande a pour objet la provision de lipopeptides qui comprennent des épitopes T auxiliaires, des épitopes CTL, une partie lipidique et des séquences espaceurs entre ces différentes parties, avec des variations possibles dans les épitopes et les espaceurs et les parties lipidiques. De plus sont revendiqués des compositions/vaccins et des utilisations vaccinales basées sur ces peptides. Le document D1 révèle un certain nombre de lipopeptides différents qui comprennent différents épitopes T auxiliaires, différents épitopes CTL, une partie lipidique ainsi des séquences espaceurs entre ces différentes parties ainsi que la formulation et l'utilisation de ces lipopeptides comme vaccins. Le document D1 est donc considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet des revendications 1-22. L'objet des dites revendications ne se distingue de cet état de la technique que par l'utilisation d'espaceurs différents. Selon les demandeurs, le problème technique consistait à augmenter la solubilité des lipopeptides dans un tampon aqueux e.g. **réduire l'hydrophobicité des lipopeptides**, pour des raisons de stérilisation et de caractérisation du produit (description, page 2, lignes 5-19). Il est à noter ici que si les demandeurs reconnaissent que "le problème à résoudre **consistait donc** à réduire l'hydrophobicité des lipopeptides" (description, page 2, ligne 16; e.g. à augmenter l'hydrophilicité des lipopeptides), il faut assumer que le problème technique a été en tant que tel apparent à l'homme de métier.

La solution proposée était, tout en maintenant une structure globale identique à celle des

lipopeptides de D1, de changer les résidus des espaceurs utilisés dans D1, par des espaceurs contenant des résidus chargés plus hydrophiles. Cette solution ne peut être considérée comme inventive pour les raisons suivantes. Les lipopeptides en question se composent de trois parties reliées par lesdits espaceurs: une partie lipidique, un épitope HTL et un épitope CTL. Si l'homme de métier voulait augmenter l'hydrophilie e.g. réduire l'hydrophobicité des dits lipopeptides, il ne peut ni modifier la partie lipidique, car elle doit rester lipidique et restera donc hydrophobe, ni les séquences des épitopes HTL et CTL, car elles sont préfixées par le système immunitaire et donc *a fortiori* pour le but vaccinal à suivre. Il ne lui reste donc que la possibilité pour augmenter l'hydrophilicité de la molécule de changer les séquences des espaceurs, afin de rendre ceux-ci plus hydrophiles. Or il est bien connu par l'homme de métier que la substitution dans une séquence d'acides aminés de résidus neutres et/ou hydrophobes par des résidus chargés augmente l'hydrophilicité et par la même réduit l'hydrophobicité de ladite séquence. Ceci est exemplifié entre autre dans D4 (colonne 17, lignes 56 à 62). Il apparaît donc que la solution proposée en réponse au problème technique, tel qu'il est formulé par les demandeurs, n'est pas inventive.

En conséquence, les lipopeptides des revendications 1-17 ne peuvent être considérés comme étant basé sur une activité inventive ni de même les spécifications évidentes des revendications 18-21, qui sont toutes basées sur lesdits lipopeptides des revendications 1-17, contrairement aux exigences de l'article 33(3) PCT.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

Les objections suivantes concernent l'article 6 PCT (clarté).

La revendication 1 manque de clarté par rapport à "comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie du lipopeptide". Cette expression ne permet ni d'apprécier combien d'acides aminés chargés et dans quel enchaînement doivent être dans la molécule du lipopeptide pour assurer l'hydrophilie. Aussi et surtout, l'homme de métier se saurait évaluer clairement quel degré d'hydrophilie (en fait solubilité dans l'eau) doit être atteint par lesdits lipopeptides et en conséquent il ne saurait distinguer les lipopeptides qui tombent sous l'étendue de la

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/00792

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

revendication. Finalement il ne ressort pas clairement de la revendication 1 si seulement un des espaceurs doit être composé d'acides aminés chargés en milieu neutre ou si ceci est également requis pour le deuxième en même temps.

M 19-05-2000
 << Choix parmi un >>

45

REVENDECATIONS

1. Lipopeptide comprenant au moins un épitope T auxiliaire, au moins un épitope CTL et au moins un résidu lipidique, caractérisé en ce que les épitopes et la partie lipidique d'une part, et les épitopes d'autre part, sont séparés indépendamment par des séquences d'acides aminés, appelées espaceurs, comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie du lipopeptide.

2. Lipopeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que les espaceurs sont globalement hydrophiles et présentent entre 1 et 10 acides aminés.

3. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 2 caractérisé en ce qu'au moins l'un des espaceurs comprend entre 1 et 10, glycines et/ou arginines.

4. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'au moins l'un des espaceurs présente l'une des séquences suivantes:

GLY ARG

- ou ARG GLY ARG.

5. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'au moins l'un des espaceurs comprend un ou plusieurs acides glutamique et/ou acides aspartique.

6. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les espaceurs intègrent une cystéine ou une chaîne alkyle fonctionnalisée par un groupe thiol et des liaisons non-peptidiques telles que des liaisons disulfure ou diméthyle.

7. Lipopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les espaceurs comprennent un groupe tel qu'un groupe thiazolidine, oxime ou hydrazone.

8. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'enchaînement :

- d'une partie lipidique,
- d'un premier espaceur,
- d'un épitope T auxiliaire,

< linéaires ou >
 << saturées ou >>
 << une ou plusieurs chaînes cloisées parmi l' >>

46

- d'un second espaceur, et
- d'un épitope CTL.

8. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'enchaînement :

- d'une partie lipidique,
- d'un premier espaceur,
- d'un épitope T auxiliaire,
- d'un second espaceur,
- d'un premier épitope CTL,
- d'un troisième espaceur, et
- d'un second épitope CTL.

9. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C₁₀ à C₂₀, éventuellement ramifiées <-> ou insaturées, ou un dérivé de stéroïde.

10. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend au moins deux chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C₁₀ à C₂₀, liées entre elles par un ou plusieurs acides aminés.

11. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la partie lipidique est constituée de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH₂ d'une lysine.

12. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend un résidu d'acide palmitique, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique, d'acide 2-amino hexadécanoïque, de pimélaute ou de trimélaute.

13. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la partie non lipidique comprend entre 15 et 100 acides aminés.

14. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est un épitope multivalent.

15. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est le peptide 830-843 de la toxine tétanique présentant la séquence suivante:

~~du régime des médicaments~~
BREVET

47

QYIKANSKFIGITE

- 16¹⁷ 17. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est l'épitope de l'hémagglutinine ou l'épitope PADRE.
- 17 18. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il contient au moins un épitope CTL d'une protéine spécifique du mélanome, d'une protéine du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la protéine p-53 ou d'une protéine du stade intra-hépatocytaire de *Plasmodium Falciparum*.
- 18 18. Utilisation d'un lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 17 pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique.
- 19 20. Utilisation d'un lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 17 pour la fabrication d'un médicament pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la p-53 du mélanome, ou de la malaria.
- 20 21. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient une dose pharmacologiquement efficace d'un ou plusieurs lipopeptides selon l'une des revendications 1 à 17 et des excipients pharmaceutiquement compatibles.
- 21 22. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il contient un ou plusieurs lipopeptides selon l'une des revendications 1 à 17.

TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE


(instruction administrative 411 du PCT)

PHELIP, Bruno
Cabinet Harle & Phélip
7, rue de Madrid
F-75008 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 30 avril 1999 (30.04.99)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1691 PCT 374	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/00792	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 avril 1999 (06.04.99)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 07 avril 1998 (07.04.98)
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) etc	

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
07 avri 1998 (07.04.98)	98/04323	FR	16 avri 1999 (16.04.99)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé:  S. Bahariou no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

WO 99/51630
PCT/FR99/00792

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Destinataire:

PHÉLIP, Bruno
Cabinet Harle & Phélip
7, rue de Madrid
F-75008 Paris
FRANCE

503

Date d'expédition (jour/mois/année)
14 octobre 1999 (14.10.99)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
1691 PCT 374

AVIS IMPORTANT

Demande internationale no
PCT/FR99/00792

Date du dépôt international (jour/mois/année)
06 avril 1999 (06.04.99)

Date de priorité (jour/mois/année)
07 avril 1998 (07.04.98)

Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM
etc

- Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

- Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR, HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU, SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1a-bis)).

- Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 14 octobre 1999 (14.10.99) sous le numéro WO 99/51630

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions après de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

J. Zahra

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

no de téléphone (41-22) 338.83.38

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1691 PCT 374	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 00792	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/04/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 07/04/1998
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulgués dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.
- ☒ Aucune des figures n'est à publier.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

FR 99/00792

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9522317	A	24-08-1995	AU 1847395 A CA 2183416 A EP 0804158 A	04-03-1995 24-08-1995 05-11-1997
GB 2271995	A	04-05-1994	NONE	
US 5637481	A	10-06-1997	CA 2114353 A EP 0610046 A JP 6319548 A	02-08-1994 10-08-1994 22-11-1994
EP 0491628	A	24-06-1992	FR 2670787 A CA 2057828 A JP 4295498 A US 5871746 A	26-06-1992 19-06-1992 20-10-1992 16-02-1999
EP 0433242	A	19-06-1991	IT 1238343 B	13-07-1993

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 novembre 1999 (19.11.99)	
Demande internationale no PCT/FR99/00792	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1691 PCT 374
Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 avril 1999 (06.04.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 07 avril 1998 (07.04.98)
Déposant LE GAL, Frédérique, Anne etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

25 octobre 1999 (25.10.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Diana Nissen

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

5000
09673166

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1691 PCT 374	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/00792	International filing date (day/month/year) 06 April 1999 (06.04.99)	Priority date (day/month/year) 07 April 1998 (07.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/025		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 25 October 1999 (25.10.99)	Date of completion of this report 13 July 2000 (13.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/00792

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-44, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims. Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-21, filed with the letter of 16 May 2000 (16.05.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings. sheets/fig 1/12-12/12, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☒ the claims. Nos. 22
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/00792

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The amendments made to the originally filed Claims 1-22 comply with PCT Article 34(2)(b). The present report has therefore been established on the basis of the newly filed Claims 1-21.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/00792

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability:
citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	3, 5, 6	YES
	Claims	1, 2, 4, 7-21	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-21	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-95 22317

D2: VITIELLO A ET AL: 'Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans', JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 1, January 1995, pages 341-349.

D3: J.P. SAUZET ET AL: 'Long lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced in vivo with chimeric-multirestricted lipopeptides', VACCINE, vol. 13, no. 14, 1995, pages 1339-1345.

D4: US-A-5 637 481.

The present application does not fulfil the requirements of PCT Article 33(2), as the subject matter of Claims 1, 2, 4 and 7-21 do not meet the criteria of novelty, as per the following:

The lipopeptides of Claims 1, 2, 7, 9 and 13 are anticipated by documents D1 (inter alia, example 7, page 56 and example 9, pages 59 and 60); D2 (page 345, figure

1) and D3 (Table 1, Lipo-NP123, page 1344). The subject matter of Claims 4 and 8 is disclosed in document D3 (Table 1, Lipo-NP123, page 1344), that of Claims 10-12, 14, 15 and 17 in document D1 (inter alia, example 7, page 56 and example 9, pages 59 and 60) and D2 (page 345, figure 1) and finally that of Claim 16 in D1 (page 29, line 15-16). It should be noted that these objections result from the unclear and too open-ended definition of the lipopeptides of Claims 1 and 2, which is discussed in detail in Box VIII of the present report. The use, as well as the composition and vaccine of Claims 18, 20 and 21, which are dependent on Claims 1-17, are known from D1 (example 9, pages 59-62), D2 (Results section, page 343, right-hand column, page 346) and D3 (page 1341, right-hand column, page 1342). The use according to Claim 19 is disclosed in D1 (example 9, pages 59-62) and D2 (Results section, page 343, right-hand column, page 346).

In brief, the subject matter of Claims 1, 2, 4, 7-21 is not novel under the terms of PCT Article 33(2), and consequently, said claims also do not involve an inventive step under PCT Article 33(3).

In more general terms, the subject matter of Claims 1-21 does not meet the criteria of inventive step under PCT Article 33(3) for the following reasons.

The aim of the present application is to provide lipopeptides containing helper T cell epitopes, CTL epitopes, a lipid portion and spacer sequences between the various portions, with possible variations in the epitopes, the spacers and the lipid portions. Furthermore, compositions/vaccines based on said peptides, and the use thereof as vaccines are also claimed. Document D1 discloses a number of different lipopeptides containing

various helper T cell epitopes, various CTL epitopes. a lipid portion and spacer sequences between these various portions, as well as the formulation and use of said lipopeptides as vaccines. Document D1 is therefore considered to be the prior art closest to the subject matter of Claims 1-22. The subject matter of said claims only differs from this prior art in terms of the use of different spacers. According to the applicants, the technical problem to be solved resided in increasing the solubility of the lipopeptides in an aqueous buffer, i.e. **reducing the hydrophobicity of the lipopeptides**, for purposes of sterilisation and characterisation of the product (description, page 2, lines 5-19). It should be noted here that, if the applicants recognise that "the problem to be solved **therefore consisted in** reducing the hydrophobicity of the lipopeptides" (description, page 2, line 16; i.e. increasing the hydrophilicity of said lipopeptides), it is to be supposed that this technical problem was apparent as such to a person skilled in the art.

The solution proposed was to change the residues of the spacers used in D1 to spacers containing more hydrophilic charged residues, while retaining an overall structure identical to the lipopeptides of D1. This solution cannot be considered to be inventive for the following reasons. The lipopeptides considered consist of three portions linked by said spacers: a lipid portion, an HTL epitope and a CTL epitope. If it was desired to increase the hydrophilicity level, i.e. reduce the hydrophobicity of said lipopeptides, a person skilled in the art would not be able to modify the lipid portion, since it must remain lipidic and therefore hydrophobic, nor the HTL and CTL epitope sequences, as they are pre-determined by the immune system and therefore *a fortiori* for the

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The following objections concern PCT Article 6 (clarity):

Claim 1 lacks clarity in view of the phrase "containing amino acid chains which are globally charged in a neutral medium, thereby ensuring the hydrophilic nature of the lipopeptide". This phrase does not specify how many charged amino acids should be present in the lipopeptide molecule, nor does it specify the chain. Most important, a person skilled in the art would not be able to assess clearly the level of hydrophilicity (in fact, the water-solubility) which needs to be achieved by said lipopeptides, and consequently, would not be able to distinguish the lipopeptides which fall under the scope of claim. Finally, it is not clear, from Claim 1, whether only one of said spacers should consist of amino acids which are charged in a neutral medium, or whether this concerns the second one also.

immunisation purpose for which they are intended. The only alternative, in order to enhance the hydrophilic nature of the molecule, is therefore to modify the spacer sequences in order to make the latter more hydrophilic. However, it is well known to a person skilled in the art that substituting neutral and/or hydrophobic residues in an amino acid sequence with charged residues enhances hydrophilicity and therefore reduces the hydrophobicity of said sequence. This is exemplified, inter alia, in D1 (column 17, lines 56 to 62). It therefore appears that the solution proposed to the technical problem, as it is formulated by the applicants, is not inventive.

Consequently, contrary to the requirements of PCT Article 33(3), the lipopeptides of Claims 1-17 cannot be considered to involve an inventive step, nor can the obvious specifications of Claims 18-21, which are all based on said lipopeptides according to Claims 1-17.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.